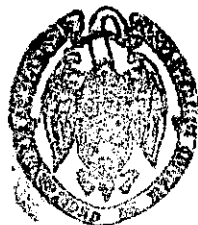


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



**INTERACCIONES DE CINCO  
ANTIFÚNGICOS CON LEUCOCITOS  
POLIMORFONUCLEARES  
NEUTRÓFILOS Y SUERO HUMANO**

**TESIS DOCTORAL**



**ARCHIVO**

**22.058**

**EVA FERNÁNDEZ SALAZAR  
MADRID, SEPTIEMBRE 1997**



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
28040 MADRID

D. JOSÉ PRIETO PRIETO Catedrático del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y D. FERNANDO MÍNGUEZ MÍNGUEZ, Profesor del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

#### CERTIFICAN

Que el presente trabajo de investigación, titulado: INTERACCIONES DE CINCO ANTIFÚNGICOS CON LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS Y SUERO HUMANO constituye la Memoria presentada por Eva Fernández Salazar para aspirar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, y ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, Julio de 1997.

Fdo. Prof. Dr. Fernando Mínguez Mínguez

Fdo. Prof. Dr. José Prieto Prieto

*Deseo expresar mi más sincera gratitud a todos los que han hecho posible el desarrollo del presente trabajo:*

*Al Prof. Dr. José Prieto, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense y director de esta Tesis, por haberme dado la oportunidad de introducirme en el apasionante mundo de la Microbiología y haber puesto a mi disposición todos los medios necesarios para llevar a cabo mi trabajo, junto con sus constantes nuevas ideas y sugerencias. Mi agradecimiento por su inapreciable ayuda.*

*Al Prof. Dr. Fernando Mínguez, codirector de esta Tesis, sin cuya decisiva colaboración este trabajo no se habría llevado a cabo; por compartir buenos y malos momentos y por haber soportado estoicamente nuestras mañanas de laboratorio.*

*Al Dr. Lorenzo Aguilar, por su inestimable aportación en forma de ideas constructivas a esta Tesis, así como su interés en la realización y lectura de la misma.*

*Al Departamento de Relaciones Profesionales de SmithKline Beecham, especialmente a Julio Avellano, Maribel Mondéjar, Ángel Rodríguez y Carmen Sánchez, por su amistad y apoyo durante la realización de la Tesis.*

*A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología, especialmente al Dr. Ziad Daoud, quien me transmitió su preocupación por el trabajo bien hecho y su temperamento crítico en el análisis de resultados. También quiero agradecerle al Dr. Mario Lozano Chiu el haberme proporcionado las nociones y la ilusión necesarias para trabajar en el laboratorio; así como todos los buenos ratos que hemos compartido entre tubos de ensayo y ordenador.*

*A mis padres y a Bosco, por haber contribuido todos estos años con su cariño y paciencia a la realización de este trabajo.*

*A Mutti y a Fernando, por proporcionarme su estímulo constante y verdadero en todos los campos del saber desde los primeros años de mi vida.*

*A DM, por haberme acompañado tantas tardes junto al ordenador; por haber resurgido de sus cenizas.*

*A LUIS, la razón de ser de este trabajo.*



## **ABREVIATURAS**

<b>%I<sub>c</sub></b>	=	Porcentaje de inhibición del crecimiento
<b>%M</b>	=	Porcentaje de muerte
<b>5FC</b>	=	5-fluorocitosina
<b>AMB</b>	=	Anfotericina B
<b>bYNB-G</b>	=	Yeast Nitrogen Base glucosado y tamponado
<b>FLU</b>	=	Fluconazol
<b>HBSS-G</b>	=	Hank's Balanced Salt Solution con gelatina al 0,1%
<b>IAN</b>	=	Índice de Adherencia a Nylon
<b>IAP</b>	=	Índice de Adherencia a Plástico
<b>IF</b>	=	Índice de Fagocitosis
<b>KTZ</b>	=	Ketoconazol
<b>NCCLS</b>	=	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>PBS</b>	=	Phosphate Buffèred Saline
<b>PMN</b>	=	(Leucocitos) polimorfonucleares neutrófilos
<b>UK</b>	=	UK 109,496

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.- INTERACCIÓN ANTIMICROBIANOS-SISTEMA INMUNE</b>	1
<b>2.- SISTEMA INMUNE</b>	2
2.1.- INMUNIDAD INESPECÍFICA O INNATA	3
2.2.- INMUNIDAD ESPECÍFICA O ADAPTATIVA	3
<b>3.- LEUCOCITOS PMN</b>	4
3.1.- INFLAMACIÓN: FUNCIONES DE LOS LEUCOCITOS PMN	6
3.1.1.- Adherencia	6
3.1.2.- Movilidad	7
3.1.3.- Capacidad microbicida: fagocitosis	10
3.1.4.- Capacidad microbicida: muerte intracelular	12
<b>4.- ANTIFÚNGICOS</b>	15
4.1.- ANFOTERICINA B	15
4.1.1.- Estructura química	16
4.1.2.- Espectro de actividad	16
4.1.3.- Mecanismo de acción	17
4.1.4.- Resistencia	17
4.1.5.- Farmacocinética	17
4.1.6.- Administración	17
4.1.7.- Efectos secundarios	17
4.2.- 5-FLUOROCITOSINA	18
4.2.1.- Estructura química	18
4.2.2.- Espectro de actividad	18
4.2.3.- Mecanismo de acción	19
4.2.4.- Resistencia	20
4.2.5.- Farmacocinética	21
4.2.6.- Administración	21
4.2.7.- Efectos secundarios	22
4.3.- KETOCONAZOL	22
4.3.1.- Estructura química	22
4.3.2.- Espectro de actividad	23
4.3.3.- Mecanismo de acción	23
4.3.4.- Resistencia	23
4.3.5.- Farmacocinética	23
4.3.6.- Administración	24
4.3.7.- Efectos secundarios	24
4.4.- FLUCONAZOL	24
4.4.1.- Estructura química	25
4.4.2.- Espectro de actividad	25
4.4.3.- Mecanismo de acción	25
4.4.4.- Resistencia	26
4.4.5.- Farmacocinética	26
4.4.6.- Administración	26
4.4.7.- Efectos secundarios	27
4.5.- UK 109,496	27
4.5.1.- Estructura química	27
4.5.2.- Espectro de actividad	28
4.5.3.- Mecanismo de acción	28
4.5.4.- Resistencia	28

4.5.5.- Farmacocinética .....	28
4.5.6.- Administración .....	29
4.5.7.- Efectos secundarios .....	29
<b>5.- SUERO</b> .....	29
<b>6.- <i>Cryptococcus neoformans</i></b> .....	30
6.1.- CÁPSULA .....	30
6.2.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	31
6.2.1.- Criptococosis pulmonar .....	31
6.2.2.- Criptococosis cutánea .....	31
6.2.3.- <i>Cr. neoformans</i> en el sistema nervioso central .....	31
6.3.- TRATAMIENTO .....	32
<b>7.- <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	35
1.- CONDICIONES GENERALES .....	35
2.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS .....	36
2.1.- SOLUCIÓN ISOTÓNICA DE CLORURO AMÓNICO .....	36
2.2.- SOLUCIÓN SALINA TAMPONADA PARA CÉLULAS HANK'S BALANCED SALT SOLUTION CON GELATINA AL 0,1% (HBSS- G) .....	36
2.3.- SOLUCIÓN SALINA TAMPONADA .....	37
2.4.- AGUA BÁSICA .....	37
2.5.- AZUL DE TRIPANO .....	37
2.6.- CALDO DE CULTIVO PARA LEVADURAS bYNB-G .....	37
2.6.1.- Tampón fosfato para caldo bYNB-G .....	37
2.6.2.- Caldo de cultivo bYNB-G .....	38
3.- INFLUENCIA DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE FUNCIONES DE LOS LEUCOCITOS PMN .....	38
3.1.- PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DEL MATERIAL .....	38
3.1.1.- Aislamiento de leucocitos PMN .....	38
3.1.2.- Antifúngicos .....	39
3.2.- ENSAYOS CON LEUCOCITOS PMN .....	41
3.2.1.- Viabilidad celular .....	41
3.2.2.- Capacidad de adherencia .....	41
3.2.3.- Capacidad de movimiento: quimiotaxis .....	43
3.2.4.- Capacidad de movimiento: movilidad espontánea .....	46
3.2.5.- Capacidad microbicida: fagocitosis .....	47
3.2.6.- Capacidad microbicida: muerte intracelular .....	49
4.- INFLUENCIA DEL SUERO EN LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	49
4.1.- MICROORGANISMO .....	49
4.2.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS .....	49
4.3.- CINÉTICA DE MUERTE .....	50
4.4.- PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO .....	51
4.5.- PORCENTAJE DE MUERTE .....	51
5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	52
<b>RESULTADOS</b> .....	54

<b>1.- EFECTO DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LAS FUNCIONES DE LOS LEUCOCITOS PMN</b>	54
1.1.- ANFOTERICINA B	54
1.1.1.- Capacidad de adherencia	54
1.1.2.- Capacidad de movimiento	55
1.1.3.- Capacidad fagocítica y poder microbicida	55
1.2.- 5-FLUOROCITOSINA	56
1.2.1.- Capacidad de adherencia	56
1.2.2.- Capacidad de movimiento	56
1.2.3.- Capacidad fagocítica y poder microbicida	57
1.3.- KETOCONAZOL	57
1.3.1.- Capacidad de adherencia	57
1.3.2.- Capacidad de movimiento	58
1.3.3.- Capacidad fagocítica y poder microbicida	58
1.4.- FLUCONAZOL	59
1.4.1.- Capacidad de adherencia	59
1.4.2.- Capacidad de movimiento	59
1.4.3.- Capacidad fagocítica y poder microbicida	60
1.5.- UK 109,496	60
1.5.1.- Capacidad de adherencia	60
1.5.2.- Capacidad de movimiento	61
1.5.3.- Capacidad fagocítica y poder microbicida	61
1.6.- MECANISMOS DE ACCIÓN TOXICOLÓGICA	62
<b>2.- EFECTO DEL SUERO SOBRE LA ACCIÓN FUNGICIDA DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE <i>Cryptococcus neoformans</i></b>	62
2.1.- ANFOTERICINA B	63
2.1.1.- IC <sub>90</sub>	63
2.1.2.- Curva de letalidad	63
2.1.3.- Tasa de inhibición del crecimiento	63
2.1.4.- Tasa de muerte	64
2.2.- 5-FLUOROCITOSINA	64
2.2.1.- IC <sub>90</sub>	64
2.2.2.- Curva de letalidad	64
2.2.3.- Tasa de inhibición del crecimiento	64
2.2.4.- Tasa de muerte	64
2.3.- KETOCONAZOL	65
2.3.1.- IC <sub>90</sub>	65
2.3.2.- Curva de letalidad	65
2.3.3.- Tasa de inhibición del crecimiento	65
2.3.4.- Tasa de muerte	65
2.4.- FLUCONAZOL	65
2.4.1.- IC <sub>90</sub>	65
2.4.2.- Curva de letalidad	66
2.4.3.- Tasa de inhibición del crecimiento	66
2.4.4.- Tasa de muerte	66
2.5.- UK 109,496	66
2.5.1.- IC <sub>90</sub>	66
2.5.2.- Curva de letalidad	66
2.5.3.- Tasa de inhibición del crecimiento	67
2.5.4.- Tasa de muerte	67

<b>TABLAS Y FIGURAS</b> .....	68
<b>DISCUSIÓN</b> .....	99
<b>1.- INFLUENCIA DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE FUNCIONES DE LOS LEUCOCITOS PMN</b> .....	99
1.1.- DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	102
1.1.1.- Extracción de leucocitos PMN.....	102
1.1.2.- Estudio de la adherencia a plástico y a nylon.....	103
1.1.3.- Estudio de la movilidad espontánea y la quimiotaxis.....	104
1.1.4.- Estudio de la fagocitosis y la muerte intracelular.....	106
1.1.5.- Concentraciones de antifúngicos valoradas.....	108
1.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	108
1.2.1.- Anfotericina B.....	108
1.2.2.- 5-fluorocitosina.....	113
1.2.3.- Ketoconazol.....	114
1.2.4.- Fluconazol.....	116
1.2.5.- UK 109,496.....	117
1.2.6.- Mecanismos de toxicidad de los antifúngicos sobre los leucocitos PMN.....	117
<b>2.- INFLUENCIA DEL SUERO SOBRE LA ACCIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A <i>Cryptococcus neoformans</i></b> .....	119
2.1.- DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	120
2.2.- EFECTO DEL SUERO HUMANO SOBRE <i>Cr. neoformans</i> .....	121
2.3.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	122
2.3.1.- Anfotericina B.....	122
2.3.2.- 5-fluorocitosina.....	123
2.3.3.- Ketoconazol.....	125
2.3.4.- Fluconazol.....	126
2.3.5.- UK 109,496.....	128
<b>CONCLUSIONES</b> .....	131
<b>1.- INFLUENCIA DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LAS FUNCIONES DE LOS LEUCOCITOS PMN</b> .....	131
<b>2.- INFLUENCIA DEL SUERO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE 5 ANTIFÚNGICOS FRENTE A <i>Cr. neoformans</i></b> .....	132
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	133

# ***INTRODUCCIÓN***

## 1.-INTERACCIÓN ANTIMICROBIANOS-SISTEMA INMUNE

En el tratamiento de todo proceso infeccioso concurren tres factores: el agente patógeno invasor, el antimicrobiano y los mecanismos de defensa del huésped, englobados estos últimos en el conjunto del sistema inmune.

A la hora de combatir una infección, todos los esfuerzos deben ir dirigidos contra el microorganismo invasor. En dicho proceso, se han descrito cuatro tipos de interacciones:

- 1) Efecto del sistema inmune sobre el microorganismo.
- 2) Efecto del fármaco antimicrobiano sobre el microorganismo.
- 3) Efecto del sistema inmune sobre la interacción fármaco-microorganismo.
- 4) Efecto del fármaco antimicrobiano sobre la interacción sistema inmune-microorganismo.

En el presente trabajo, se abordarán los puntos 3 y 4, tomando como elementos del sistema inmune el suero y los leucocitos PMN; como antimicrobianos se incluirán cinco antifúngicos, y los microorganismos de referencia serán la bacteria *Staphylococcus aureus* y el hongo levaduriforme *Cryptococcus neoformans*.

Las interacciones existentes entre los agentes antiinfecciosos y los diversos componentes del sistema inmune han sido objeto de constante interés durante los últimos años, por varias razones:

- ♦ En primer lugar, un mejor entendimiento de las relaciones fármaco-mecanismos de inmunidad puede contribuir a reducir las infecciones nosocomiales.

- ♦ Las infecciones en pacientes inmunocomprometidos pueden ser muy difíciles de tratar, e implican la necesidad de evitar quimioterápicos que disminuyan la actividad antimicrobiana del sistema inmune.
- ♦ Los fármacos que inhiben los mecanismos de defensa, por otra parte, pueden resultar de utilidad como terapia en pacientes que han sido trasplantados o que padecen alguna enfermedad autoinmune.
- ♦ Finalmente, y en un futuro no muy lejano, los antimicrobianos que influyen en la actividad inmunitaria podrían emplearse como instrumento en el estudio de los mecanismos que generan la respuesta inmune en la infección.

## **2.--SISTEMA INMUNE**

El sistema inmune se compone de un conjunto de células, tejidos y moléculas cuya función primordial consiste en salvaguardar el medio interno del organismo destruyendo a los posibles organismos invasores.

Para entender el sistema inmune, es importante señalar que interactúa de forma dinámica con todos los tejidos del organismo. Como consecuencia de dichas interacciones, el buen funcionamiento de las defensas inmunitarias es esencial para el adecuado funcionamiento del organismo como un todo. Cuando los mecanismos defensivos fallan, las consecuencias se dejan notar en el resto del organismo, y a su vez, disminuye su resistencia a la infección **(1)**.

A continuación, se detallan esquemáticamente los principales componentes del sistema inmune **(FIGURA 1)**.



## **2.1. INMUNIDAD INESPECÍFICA** **O INNATA**

Actúa como primera línea de defensa frente a los agentes infecciosos. Si sus barreras quedan superadas, se activa:

**a) Barreras naturales:** como el revestimiento mucocutáneo que impide la penetración del patógeno.

**b) Factores humorales:**

- ⇒ Piel
- ⇒ Lágrimas
- ⇒ Suero
  - Complemento
  - Properdina
  - Otras proteínas

**c) Factores celulares (células fagocíticas)**

- ⇒ Sistema mononuclear (macrófagos)
- ⇒ Sistema polimorfonuclear (leucocitos PMN)

## **2.2. INMUNIDAD ESPECÍFICA** **O ADAPTATIVA**

Se elabora una reacción específica para cada agente infeccioso, se guarda memoria y se puede impedir la reinfección.

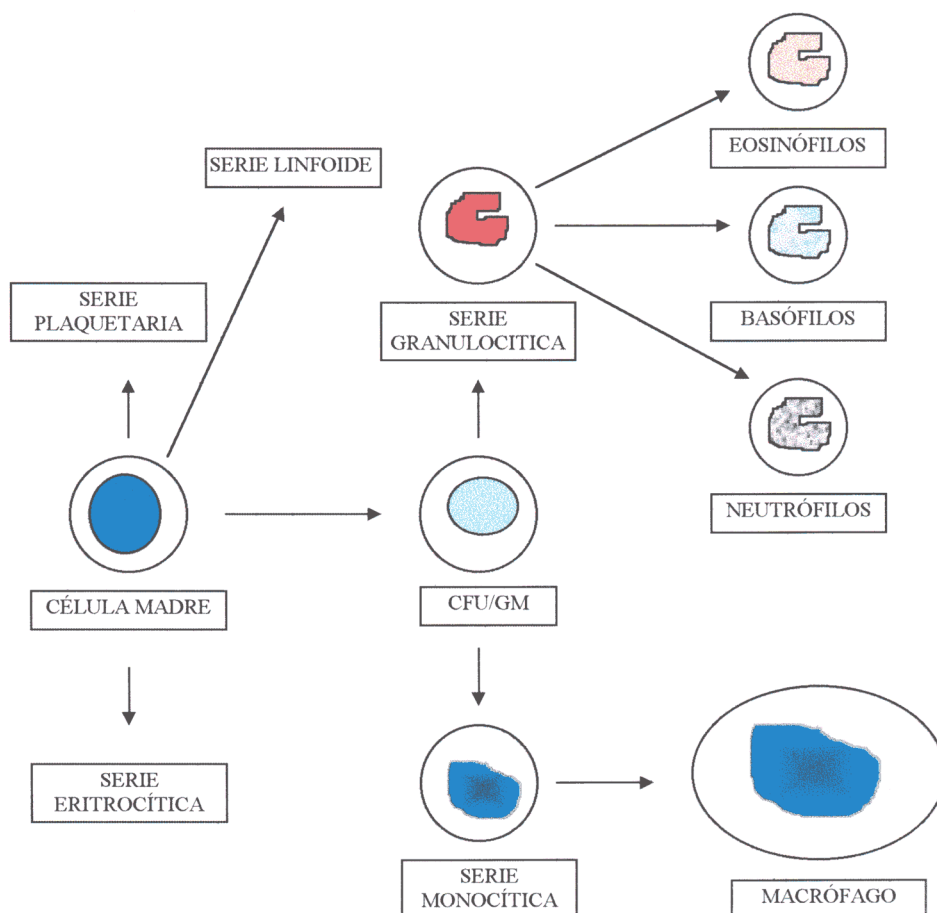
**a) Inmunidad celular:**  
Linfocitos T.

**b) Inmunidad humoral:**  
Linfocitos B  
(anticuerpos)

**FIGURA 1.** Principales componentes del sistema inmune. Tomado de Staines N. y cols (1), Roitt I. y cols (2), Bellanti J. (3).

### 3.- LEUCOCITOS PMN

Los leucocitos PMN representan normalmente el 60-70% de los glóbulos blancos en la sangre periférica del hombre adulto. Su formación en la médula ósea se lleva a cabo a partir de una célula madre pluripotencial, de la que irán surgiendo las distintas series celulares por sucesivas diferenciaciones.



**FIGURA 2.** Formación de las células sanguíneas. Tomado de Staines N. y cols (1), Roitt I. y cols (2).

El PMN maduro tiene un diámetro de 12-15  $\mu\text{m}$ . Posee un núcleo con 2-5 lóbulos separados, y en el citoplasma se aprecian un gran número de gránulos, que pueden ser: azurófilos, o específicos (4). Su contenido se detalla en la **FIGURA 3**:

	AZURÓFILOS	ESPECÍFICOS
ELEMENTOS MICROBICIDAS	Mieloperoxidasa Lisozima	Lisozima
PROTEASAS NEUTRAS	Elastasa Cathepsina G	Colagenasa
OTROS	Hidrolasas ácidas	Lactoferrina Proteínas que unen Vitamina B <sub>12</sub>

**FIGURA 3.** Contenido de los gránulos de los leucocitos PMN. Tomado de Dale MM. y cols (4).

Los neutrófilos permanecen circulando en sangre durante un breve periodo, posiblemente sólo unas pocas horas; transcurrido este tiempo, emigran a los tejidos, donde finalizan su ciclo vital en pocos días.

Aproximadamente el 50% de los PMN que se encuentran en la sangre se hallan en circulación, y la otra mitad adheridos al endotelio vascular, un fenómeno denominado marginación. Éstos últimos pueden movilizarse rápidamente a la circulación bajo el efecto de un estímulo tan simple como un pequeño incremento de adrenalina en sangre (5).

### **3.1.- INFLAMACIÓN: FUNCIONES DE LOS LEUCOCITOS PMN.**

#### **3.1.1- ADHERENCIA.**

La aparición de un estímulo inflamatorio se traduce en un incremento del número de células adheridas al endotelio vascular. Aunque el mecanismo específico que induce este fenómeno aún no se conoce del todo, parece ser que las endotoxinas que el agente patógeno introduce en circulación podrían aumentar la capacidad de adherencia de los PMN (5). Asimismo, la activación del complemento subsiguiente a la entrada del elemento infeccioso induce la liberación de **C5a** a la circulación, produciendo un aumento de adhesividad de los PMN, con el resultado de un incremento del número de células marginadas (5).

Tras el contacto de las células con la pared vascular, se incrementa la ya existente capacidad de adherencia, que se ve aumentada en presencia de factores quimiotácticos (6-10). Por otra parte, intervienen en tal fenómeno cargas negativas de superficie, que tienden a que la adherencia sea reversible. Tras adherirse, las células han de deformarse para salir del vaso a través de los espacios intercelulares, un mecanismo denominado diapédesis (6).

##### **3.1.1.1. Metodología de estudio.**

La capacidad de adhesión de los PMN se mide normalmente como:

- ♦ Adherencia a superficies (vidrio, plástico en incluso tejidos), mediante conteo directo de las células adheridas o las no adheridas (11).
- ♦ Retención en columnas de fibra de nylon (11)(12), donde no se mide únicamente la capacidad de adherencia de los PMN, sino que también se ve reflejada cualquier alteración en la deformabilidad normal de la membrana como un aumento en la retención de la columna (11).

### 3.1.2- MOVILIDAD.

El mecanismo de migración de los PMN al lugar de la inflamación presenta aún hoy puntos no esclarecidos. Los leucocitos poseen diferentes tipos de movimientos, cuya nomenclatura se ha estandarizado recientemente: **(6) (13-15).**

#### a) Movilidad espontánea.

La célula se mueve sin una dirección fija. No existe estímulo exógeno discernible que oriente la dirección celular.

#### b) Movilidad direccional.

Es la locomoción celular en una dirección preferente. El eje de dirección de la célula está orientado en relación con un determinado estímulo. Se diferencian los siguientes tipos **(6) (13):**

I. Quimioquinesis: ciertas sustancias químicas del medio determinan la velocidad del movimiento celular.

II. Quimiotaxis: la locomoción celular se encuentra dirigida por sustancias químicas del medio (citotaxinas o quimioatrayentes).

De los tipos de movimiento existentes en los leucocitos PMN, la quimiotaxis es el mejor conocido y el que ocupa una posición más destacada en el desplazamiento de las células al foco de infección **(6).**

Las sustancias quimiotácticas pueden ser de varios tipos:

- ♦ Sustancias derivadas del sistema del complemento: son los factores quimiotácticos endógenos más importantes **(6)**. El más abundante es el **C5a**, fragmento resultante de la activación del componente **C5**. Se genera

en la superficie de microorganismos o células dañadas, cuando el complemento resulta activado, y al liberarse origina un gradiente que detectan los leucocitos mediante receptores específicos de membrana (7). De esta manera, los PMN se dirigen al núcleo donde se localiza el agente infeccioso (5).

- ♦ Sustancias bacterianas: ciertas bacterias generan **N-formil-metionil** péptidos, del tipo **formil-Met-Leu-Phe** (FMLP) con actividad quimioatrayente directa para PMN y monocitos (6) (16) (17). Además, los complejos antígeno-anticuerpo inducen la liberación de otros agentes quimiotácticos tras la activación del sistema del complemento (6).
- ♦ Leucotrienos. Son productos derivados del ácido araquidónico, liberado por neutrófilos y otras células como respuesta a diversos estímulos, y que poseen actividad quimioatrayente para los propios PMN (5). Su mecanismo exacto de actuación ante la infección podría ser amplificar la respuesta de los PMN (5).
- ♦ Proteínas desnaturalizadas y en general sustancias producto del daño tisular o celular (18). Representan un mecanismo de "limpieza" del organismo de sustancias de desecho, que no requiere un sistema de reconocimiento muy específico (5) (14).
- ♦ Linfoquinas. Son sustancias liberadas por los linfocitos. Se sabe que son capaces de dirigir a los leucocitos al núcleo inflamatorio (1) (5) (19), aunque su mecanismo específico de actuación aún no se conoce.

En general, los factores citados poseen efecto quimioatrayente sobre los PMN a bajas concentraciones. Sin embargo, en el foco infeccioso dichas sustancias se encuentran a muy elevada proporción, induciendo un incremento en la adhesividad y explosión respiratoria de los neutrófilos (5) (20).

La quimiotaxis de los PMN implica que poseen en su membrana un mecanismo sensorial capaz de detectar diferencias de gradiente quimiotáctico en el medio (6). Algunos estudios han demostrado la existencia de receptores específicos para sustancias quimioatrayentes en la superficie de granulocitos y monocitos (21-25). Durante la progresión celular -se mueven mediante pseudópodos-, los complejos sustancia quimiotáctica-receptor son ingeridos. De esta manera, se desactiva el mecanismo de la movilidad una vez que ésta ha alcanzado su grado máximo.

El sistema de transducción de la señal generada por los factores quimiotácticos unidos a sus receptores es mal conocido, pero parece estar relacionado con la transmetilación de fosfolípidos (5) (26) y esterasas de membrana (5).(27). El movimiento celular está relacionado con el intercambio de iones, sobre todo  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ; éstos activan la despolarización de la membrana plasmática y los microfilamentos de actina, miosina y gelsoína (8) (20).

### 3.1.2.1. Metodología de estudio.

La migración de los PMN puede medirse de varias formas, las cuales se pueden separar en dos grandes grupos (28) (29):

1. Aquéllos en los que se estudia el comportamiento de células individuales expuestas o no a un agente quimiotáctico. Se incluyen técnicas cinematográficas, que permiten un estudio detallado del movimiento de las células a lo largo del tiempo.
2. Aquéllos en los que una gran población celular se desplaza en presencia o ausencia de agente quimiotáctico. Después de un intervalo de tiempo, se detiene el movimiento y se examina la distribución de las células. Estos métodos son los que más frecuentemente se utilizan. Se incluyen en este grupo la técnica de filtros de "microporos" (cámara de Boyden) (30) y la técnica de agarosa (31).

- ♦ Cámara de Boyden (30). Establece una valoración exacta de la capacidad deformatoria y migratoria de la célula a través de los poros de un filtro.
- ♦ Placas de agarosa (31). Utiliza una solución especial, llamada gel de agarosa. Detecta, al igual que la técnica anterior, alteraciones en la movilidad celular, así como el comportamiento ante distintos factores quimiotácticos (6).

### 3.1.3. CAPACIDAD MICROBICIDA: FAGOCITOSIS.

La fagocitosis consta de dos etapas bien diferenciadas: reconocimiento de la partícula extraña e ingestión (5) (32-34).

La unión del PMN al agente invasor requiere el reconocimiento por parte de la membrana plasmática del leucocito. La ingestión del microorganismo precisa la acción del sistema de microfilamentos de actina y miosina.

#### 1. Reconocimiento.

Los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos poseen receptores en su membrana plasmática para la región Fc de la inmunoglobulina G (IgG), llamados **receptores Fc**, y también para el componente **C3b** del complemento. Durante el transcurso de una respuesta inmune ante una infección por cualquier microorganismo, éste o la partícula extraña resulta cubierto por **C3b** y los anticuerpos, cuya región Fc queda libre. El proceso se conoce como **opsonización (1) (5) (34-38)**. Así, IgG y C3b interaccionan también con sus respectivos receptores de la membrana del neutrófilo, y la partícula opsonizada queda unida a éste.



## 2. Ingestión.

La ingestión es el resultado de la formación de una vacuola por parte de la membrana plasmática del neutrófilo, que envuelve la partícula o microorganismo a fagocitar. El mecanismo consiste en la unión de ambas membranas mediante un sistema de “cierre en cremallera” (5), en el cual se da una unión sucesiva entre los ligandos adheridos a la partícula y los receptores de la membrana plasmática del fagocito. Al mismo tiempo, entran en acción las redes citoplasmáticas de actina, las cuales favorecen el movimiento del citoesqueleto celular. De esta manera, se constituye una vesícula que envuelve a la partícula llamada **fagosoma**, la cual se dirige a través del citoplasma hacia el aparato de Golgi, donde tendrá lugar la fusión del fagosoma con los gránulos citoplasmáticos del neutrófilo. Este proceso se denomina **degranulación** (6).

### 3.1.3.1. Metodología de estudio.

1. Los **métodos directos** implican el conteo de los microorganismos fagocitados (34).

- ♦ **Recuento de levaduras: *Candida albicans***. Se utiliza esta técnica principalmente para valorar el efecto de los fármacos antibacterianos, ya que éstos no afectan a la levadura. Mediante este método, la fagocitosis resulta fácilmente detectable por microscopía óptica y tinción con un colorante, como por ejemplo azul de tripano (39).
- ♦ **Recuento de bacterias: *Staphylococcus aureus***. Es la bacteria más comúnmente utilizada en este tipo de ensayos, cuando se estudian antifúngicos (6) (40).

- \* El marcaje de las bacterias con radioisótopos o con sustancias visibles bajo luz ultravioleta, facilita la diferenciación entre las células fagocitadas y las libres, mediante la emisión de radiactividad en el primer caso, y utilizando el microscopio de luz ultravioleta en el segundo (41) (42).
- \* El recuento de viables consiste en la separación, mediante centrifugación, de las bacterias fagocitadas de las que no lo están. Tras la siembra en placas de agar de éstas últimas, se procede a su cuantificación (42) (43).

2. Los métodos indirectos miden el efecto global del fármaco en el proceso fagocítico determinando los cambios en la quimioluminiscencia o en la producción de radicales (44).

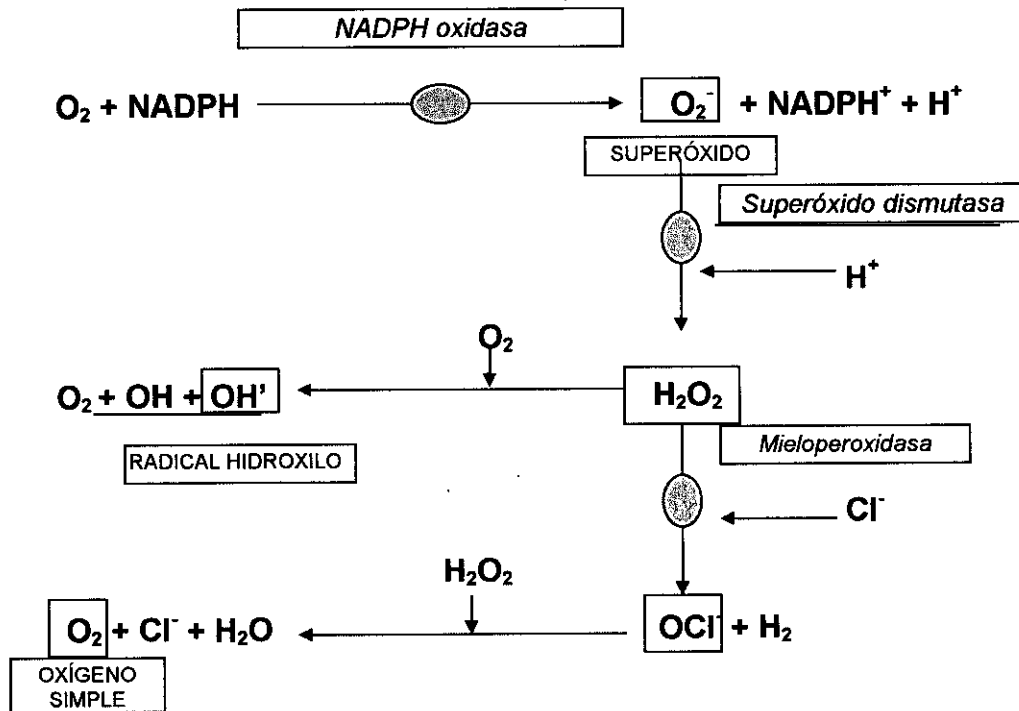
#### 3.1.4. CAPACIDAD MICROBICIDA: MUERTE INTRACELULAR.

Los mecanismos antimicrobianos de los fagocitos se diferencian en dependientes e independientes del oxígeno (45-47).

##### a) Mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno.

Desde el comienzo de la quimiotaxis, pero sobre todo durante la fagocitosis, se desencadenan en el leucocito PMN una serie de reacciones metabólicas que, dada su intensidad, han recibido el nombre de **explosión metabólica**. Durante la misma, se activa el denominado “**shunt**” **hexosa-monofosfato**, y se da un incremento considerable en el consumo de oxígeno por parte de la célula, el cual será utilizado para producir derivados líticos para los microorganismos.

El consumo de oxígeno se encuentra en relación directa con la intensidad de la fagocitosis, llegando a ser 50 veces superior al de la célula en reposo (6) (37) (48) (49).



**FIGURA 4.** Activación de la enzima NADPH oxidasa. Tomado de Mims CA. (37).

La base de este consumo de oxígeno, que no es mitocondrial, está en la activación de la enzima **NADPH oxidasa** (5) (47) (49) (FIGURA 4), que se encuentra en las membranas plasmáticas y del fagosoma, e interviene reduciendo el oxígeno a superóxido (FIGURA 4). Dada su inestabilidad, este anión reacciona rápidamente a través de una **dismutasa**, produciendo oxígeno y peróxido de hidrógeno. Al mismo tiempo, la glucosa se metaboliza a través del "shunt" hexosa-monofosfato para regenerar el NADPH, consumido por el enzima NADPH oxidasa (6) (37) (47-49).

El peróxido de hidrógeno resulta tóxico en sí mismo, pero su actividad bactericida se incrementa enormemente, ya que se reduce y da lugar a un radical hidroxilo; por otro lado, induce una halogenación mediada por la enzima

**mieloperoxidasa** para generar un compuesto de oxígeno y cloro. Dicha sustancia no sólo lisa la pared bacteriana, sino que, además, reacciona con peróxido de hidrógeno para formar oxígeno puro, de fuerte actividad microbicida (37).

El radical libre hidroxilo, los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno,  $\text{OCl}^-$  y el oxígeno puro son producidos en la pared del fagosoma, y todos son sumamente tóxicos para los microorganismos, fundamentalmente bacterias y hongos.

#### **b) Mecanismos microbicidas independientes del oxígeno.**

Ciertas bacterias, en especial algunas especies de géneros gram negativos, son destruidas por los PMN, con independencia de que el medio sea aerobio o anaerobio. También pueden ser lisadas por extractos derivados de células tras la fagocitosis (37), lo que demuestra la existencia en los fagocitos de sistemas microbicidas independientes del oxígeno. Entre estos mecanismos podemos citar:

- 1) El medio ácido existente en el fagosoma, con valores de pH hasta de 3,5 (37).
- 2) Los gránulos liberados en el interior del fagosoma contienen sustancias antimicrobianas como:
  - Lactoferrina: une hierro incluso a pH ácido. No provoca muerte, pero sí despoja de hierro al microorganismo fagocitado.
  - Lisozima: se encuentra implicada en la ruptura de enlaces glicosídicos en la pared celular.
  - Proteínas catiónicas: se adhieren a la bacteria y poseen actividad microbicida en condiciones alcalinas (6) (47). Las más conocidas son las BPI (37).

### 3.1.4.1. Metodología.

La función de muerte intracelular en los leucocitos PMN puede valorarse mediante métodos directos e indirectos **(11) (42)**.

a) Métodos indirectos.

- **Valoración de la actividad respiratoria:** se mide la emisión de luz (quimioluminiscencia) que acompaña al estallido metabólico del PMN. **(11) (42)**.

b) Métodos directos.

- **Recuento de viables:** el desarrollo de esta técnica es el mismo que en la fagocitosis, salvo ligeras modificaciones **(43)**.

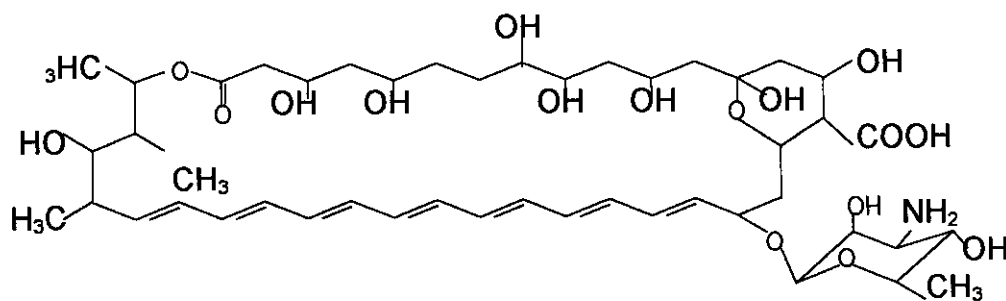
## 4.- ANTIFÚNGICOS.

### 4.1.- ANFOTERICINA B.

Desde hace 30 años, AMB ocupa un lugar relevante en el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas. Constituye la terapia de elección en muchas ocasiones **(50-55)**, a pesar de los efectos secundarios que induce y el desarrollo de nuevas moléculas **(56)**.

Anfotericina A y anfotericina B son productos de la fermentación de *Streptomyces nodosus*, un actinomicete del suelo. Se aislaron por primera vez en 1953 **(50) (57)**, aunque anfotericina A no llegó a desarrollarse.

#### 4.1.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.



**FIGURA 5.** Estructura química de la molécula de anfotericina B. Tomado de Warnock DW. (58).

AMB es un polieno insoluble en agua, cuya estructura se dilucidó en 1970. (58) (59). Posee un gran anillo macrólido de 37 átomos de carbono, con 7 dobles enlaces a un lado y el mismo número de grupos hidroxilo (FIGURA 5). La molécula es anfotérica, es decir, forma sales solubles en medio ácido y en medio básico (50) (60) (61).

AMB se encuentra comercializada actualmente en forma de complejo con desoxicolato sódico. En los años 70 se desarrollaron sales de métil-éster del antifúngico, las cuales reducían la toxicidad en un primer momento, aunque posteriormente se comprobó que no era así. Actualmente la AMB liposomal está alcanzando gran popularidad entre los clínicos, ya que reduce en gran medida los efectos adversos de AMB sin disminuir su eficacia antifúngica (56) (62).

#### 4.1.2 ESPECTRO DE ACTIVIDAD.

AMB posee actividad contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Aspergillus* spp., entre otros. (50) (52) (56) (61) (63) (64) (65). Las especies de *Candida* no *albicans* son en general menos sensibles (65) (66).

#### **4.1.3. MECANISMO DE ACCIÓN.**

AMB actúa uniéndose al **ergosterol**, el esteroide de membrana más abundante en las levaduras. Altera su impermeabilidad y provoca la pérdida de protones y cationes de la célula. Debido a la disminución del gradiente de protones, la célula fúngica pierde sus constituyentes, con lo que termina por morir. (65) (66).

#### **4.1.4. RESISTENCIA.**

La resistencia a AMB se encuentra asociada con alteraciones en la naturaleza o el número de esteroides presentes en la membrana fúngica (58). Se han detectado cepas resistentes en *Candida albicans* (67) y algunas especies no *albicans* (58) (68), aunque en general la mayoría de las cepas mutantes de estas especies son menos virulentas que las normales (67) (69).

#### **4.1.5. FARMACOCINÉTICA.**

AMB presenta una elevada unión a proteínas, superior al 90% (56) (65). Su vida media alcanza las 24-48 horas (70) (71), y las concentraciones séricas que siguen a una dosis de AMB normalmente no superan los 2 µg/ml (56).

#### **4.1.6. ADMINISTRACIÓN.**

AMB se administra por vía intravenosa, con dosis que varían entre 0,3-1,5 mg/kg/día, aunque inicialmente la dosis debe ser menor con vistas a tantear la posible intolerancia del paciente (56) (70).

#### **4.1.7. EFECTOS SECUNDARIOS.**

El efecto adverso más importante producido por AMB es la nefrotoxicidad, resultado de una reducción en la filtración glomerular (56) (72). Además, su aplicación presenta otros efectos tóxicos, como fiebre, cefaleas y vómitos (66). Por

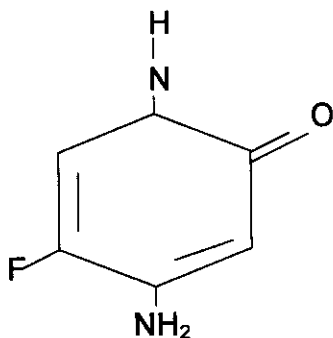
último, la administración de AMB puede inducir un aumento en los niveles de urea y creatinina, así como un descenso en la concentración de potasio y magnesio.

#### 4.2.- 5-FLUOROCITOSINA.

Flucitosina, o 5-fluorocitosina (5FC) es un antifúngico sintético. Fue sintetizado por vez primera en 1957, durante el transcurso de una investigación en busca de nuevos agentes antineoplásicos.

##### 4.2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.

5FC es un análogo de pirimidina fluorado, soluble en agua, de estructura similar al 5-fluoruracilo (**FIGURA 6**).



**FIGURA 6.** Estructura química de la molécula de 5-fluorocitosina. Tomado de Bennett JE. (65).

##### 4.2.2. ESPECTRO DE ACTIVIDAD.

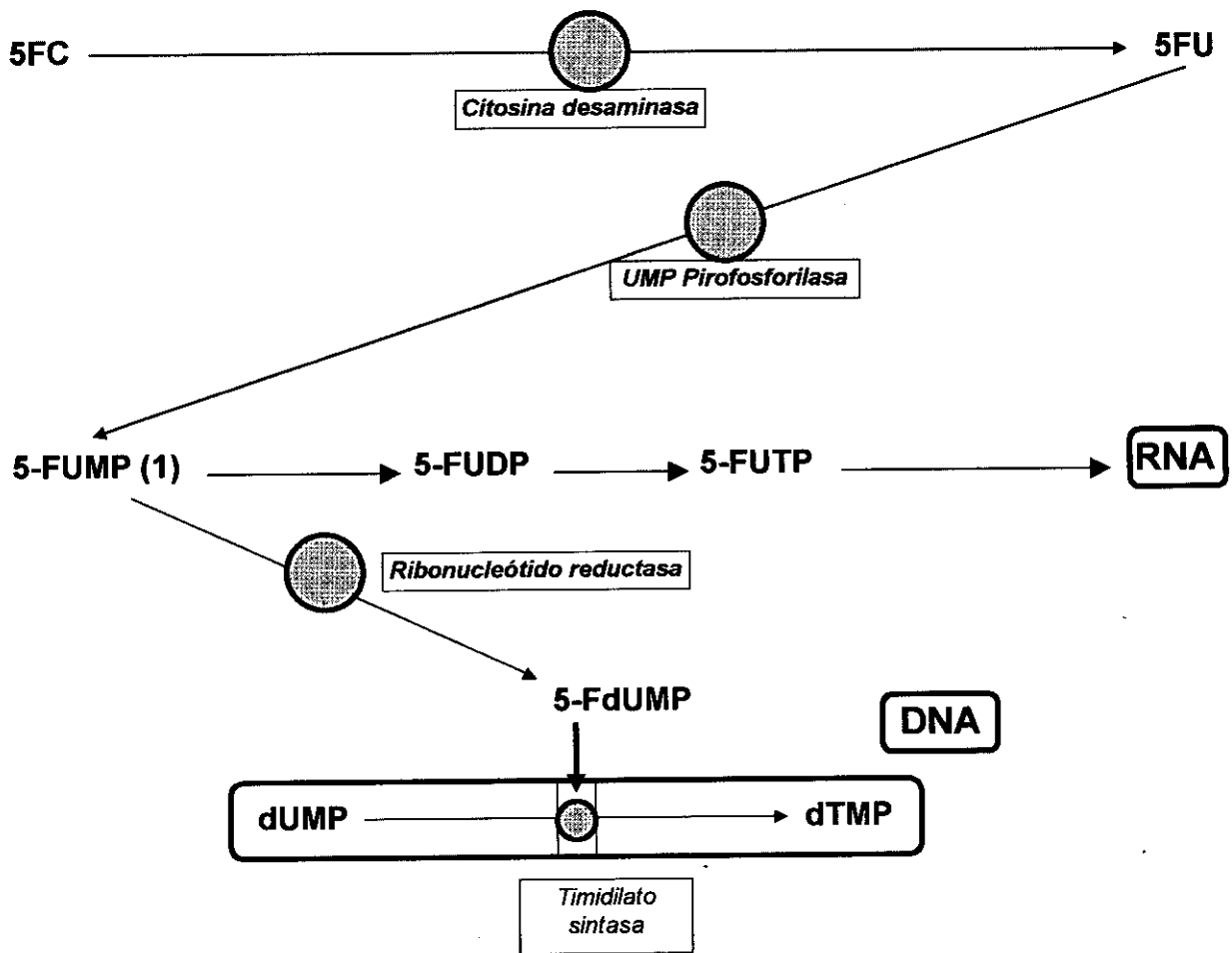
5FC posee actividad clínica frente a *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp. y todos los agentes causantes de la cromomicosis (**65**).



#### 4.2.3. MECANISMO DE ACCIÓN.

5FC penetra a través de la membrana plasmática fúngica, con la ayuda de la enzima **citocina permeasa** y se dirige al núcleo de la célula. Posee 2 mecanismos de acción posibles (**FIGURA 7**):

- a) Mediante el enzima **citocina desaminasa**, 5FC se convierte en la molécula **5-fluoruracilo (5FU)**, el cual, tras sucesivas reacciones intermedias, se transforma en **5-fluorouridina trifosfato (5FUTP)**. Este compuesto se incorpora con posterioridad al RNA fúngico, con la consiguiente inhibición de la síntesis proteica (**73**) (**74**).
- b) 5FC se convierte en **5-fluorodesoxiuridina monofosfato (5FdUMP)**, en una reacción catalizada por la enzima **uridina monofosfato pirofosforilasa**. La nueva molécula inhibe la actividad enzimática de **timidilato sintetasa**, y en consecuencia la síntesis de DNA en la célula fúngica (**73**) (**75**) (**76**)



<b>5FU =</b>	5 fluoruracilo
<b>5FUMP =</b>	5 fluoruridina monofosfato
<b>5FUDP =</b>	5 fluoruridina difosfato
<b>5FUTP =</b>	5 fluoruridina trifosfato
<b>5FdUMP =</b>	5 fluorodesoxiuridina monofosfato
<b>dUMP =</b>	Desoxiuridina monofosfato
<b>dTMP =</b>	Desoxitimidina monofosfato (T 10)

**FIGURA 7.** Mecanismo de acción de 5-fluorocitosina. Tomado de Bennett JE. (65).

#### 4.2.4. RESISTENCIA.

La resistencia a 5FC que se adquiere en el transcurso del tratamiento (resistencia secundaria) es la causa de que se produzcan fallos en la terapia de la candidiasis y la criptococosis cuando se administra como único antifúngico (65).

La resistencia a 5FC se debe a mutaciones que afectan a la producción de las enzimas **uridina monofosfato pirofosforilasa, citosina permeasa o citosina desaminasa. (73) (77) (78)**. Dichas mutaciones también pueden afectar a la producción de pirimidinas, incrementándola.

#### **4.2.5. FARMACOCINÉTICA.**

La 5FC no presenta unión a proteínas plasmáticas. Su vida media alcanza las 6 horas en individuos normales, y las máximas concentraciones en plasma son de 80 µg/ml, medidas 1 ó 2 horas tras una dosis estándar. El límite de toxicidad de dichas concentraciones está en 100 µg/ml **(65)**.

#### **4.2.6. ADMINISTRACIÓN.**

La utilización de 5FC en clínica es actualmente objeto de numerosas controversias. Como terapia única, induce la aparición de resistencias **(63) (70) (73) (79) (80)**, por lo que se recomienda su empleo junto con AMB **(79) (80)**.

En muchos estudios se ha comprobado que el tratamiento de diversas infecciones fúngicas sistémicas con anfotericina B y 5-fluorocitosina conjuntamente resulta más ventajoso que la monoterapia con AMB **(79) (80)**. No obstante, los efectos secundarios tóxicos que puede presentar la administración de AMB, principalmente en pacientes inmunodeprimidos, ha inducido la aplicación de nuevas combinaciones de 5FC con azoles, (fluconazol, itraconazol y ketoconazol) con resultados esperanzadores, sobre todo en pacientes afectados de meningitis criptococócica **(79) (81-86)**.

5FC se administra por vía oral en cantidades de 50-150 mg/kg diarios, repartidos en 4 dosis **(73) (87)**. Sin embargo, se ha observado que su administración junto con 0,5-1,5 mg/kg de AMB eleva los niveles de 5FC en suero por encima de 100 µg/ml. Por ello, se recomienda establecer un seguimiento monitorizado de la concentración de 5FC en plasma **(73) (79)**.

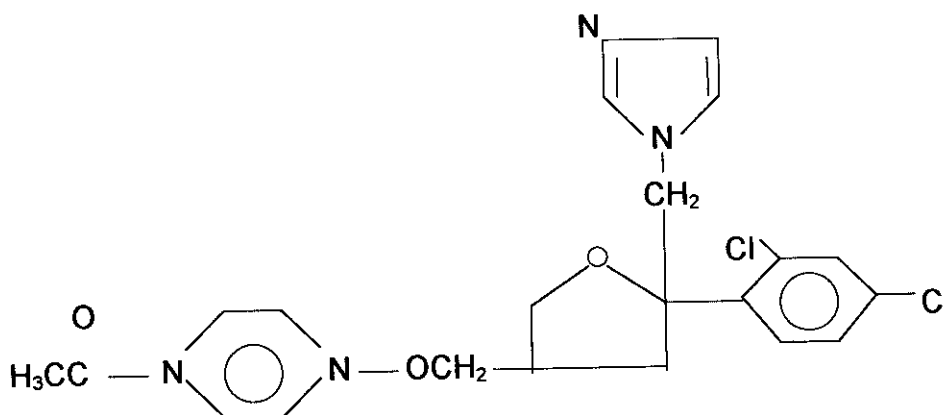
#### 4.2.7. EFECTOS SECUNDARIOS.

Durante los últimos años, la administración de 5FC se ha venido asociando con patologías de disfuncionalidad en la médula ósea (73) (86-89), así como con necrosis hepática (79). No obstante, recientes investigaciones apuntan que los efectos adversos citados se dan en mucha menor proporción si no se permite que los niveles del antifúngico superen los 100 µg/ml (65) (79) (90) (91).

#### 4.3. KETOCONAZOL.

Ketoconazol es un derivado imidazólico sintético, insoluble en agua, perteneciente a la familia de antifúngicos azólicos. Su síntesis, en la década de los años 70, vino a llenar un vacío terapéutico frente a las infecciones fúngicas superficiales y sistémicas, tratadas hasta entonces, casi exclusivamente, con anfotericina B y 5-fluorocitosina.

##### 4.3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.



**FIGURA 8.** Estructura química de la molécula de ketoconazol. Tomado de Bennett JE. (65).

El ketoconazol consta de un anillo imidazólico que contiene dos átomos de nitrógeno, junto con una compleja cadena lateral unida a uno de dichos átomos (FIGURA 8) (92).

#### **4.3.2. ESPECTRO DE ACTIVIDAD.**

KTZ posee un amplio espectro de acción *in vitro* (93) (94), quedando restringido *in vivo* a infecciones fúngicas superficiales, candidiasis (en todas sus formas), blastomycosis e histoplasmosis. Su escasa penetración en el líquido cefalorraquídeo lo hace poco efectivo *in vivo* frente a la meningitis criptocócica (65).

#### **4.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN.**

KTZ, al igual que el resto de los azoles, actúa sobre la síntesis del ergosterol en la membrana fúngica, inhibiendo la función del citocromo P-450, en cual cataliza la transformación de lanosterol a ergosterol (65) (66) (95-97). El resultado es una disminución drástica del nivel de ergosterol en la membrana y un acúmulo de esteroides aberrantes. De esta manera, las funciones del ergosterol como componente de la membrana quedan anuladas (66) (98), alterando otros mecanismos enzimáticos y desorganizándose la estructura de la membrana plasmática fúngica (66) (99-101).

#### **4.3.4. RESISTENCIA.**

La resistencia encontrada a KTZ se debe fundamentalmente a la larga duración del tratamiento (94). El mecanismo implica el bloqueo de la entrada del fármaco en la célula, así como la capacidad del hongo de sintetizar ergosterol evitando la ruta enzimática sobre la que actúa KTZ.

#### **4.3.5. FARMACOCINÉTICA.**

KTZ presenta una elevada afinidad por las proteínas plasmáticas (en torno al 96%) (92) (93). Su vida media puede alcanzar las 8 horas (65), y su buena disolución depende de que encuentre un medio ácido. Se pueden encontrar en

suero concentraciones de hasta 4 µg/ml tras la administración de una dosis estándar (65).

#### **4.3.6. ADMINISTRACIÓN.**

KTZ se administra oralmente en dosis de 200 mg dos veces al día (70) o 400 mg una vez al día (65).

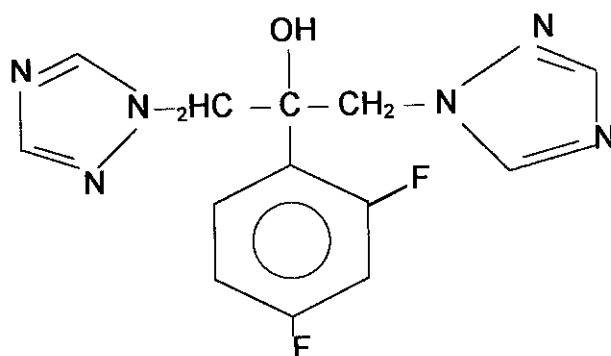
#### **4.3.7. EFFECTOS SECUNDARIOS.**

KTZ posee una cierta afinidad por los sistemas enzimáticos dependientes del citocromo P-450 de las células de mamífero (66) (102) (103). Además, inhibe los mecanismos responsables de la síntesis del colesterol (66) y de hormonas esteroideas en el hombre. Como consecuencia, produce inhibición de la síntesis de testosterona y glucocorticoides, induciendo ginecomastia e insuficiencia adrenérgica (66) (104).

### **4.4. FLUCONAZOL.**

Fluconazol (FLU) es un derivado bistriazólico de la familia de los azoles. Fue descubierto y sintetizado a finales de los años 80, cuando el incremento de las micosis sistémicas a causa del SIDA hacía necesario un antifúngico de administración oral, de baja toxicidad y que generase escasa resistencia (105-108).

#### 4.4.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.



**FIGURA 9.** Estructura química de la molécula de fluconazol. Tomado de Larsen RA. (105).

El fluconazol se diferencia estructuralmente del KTZ en que posee tres átomos de nitrógeno en cada uno de los dos anillos azólicos (102).

#### 4.4.2. ESPECTRO DE ACTIVIDAD.

FLU posee un amplio espectro de acción antifúngica (102) Según los resultados obtenidos algunos de los estudios más recientes (102) (109) (110), FLU es activo *in vitro* contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* y *Cryptococcus neoformans*, mientras que *Aspergillus* spp. se mostró resistente.

La actividad *in vivo* de FLU es mayor que *in vitro* (102) (103), y actúa, además, frente a *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis* (65).

#### 4.4.3. MECANISMO DE ACCIÓN.

El mecanismo de acción de FLU es básicamente el mismo que el de KTZ: se une a la membrana plasmática fúngica e inhibe el enzima P-450, con lo que disminuye el nivel de ergosterol de membrana. Además, altera la permeabilidad de

la membrana, modifica la actividad enzimática y anula la replicación celular (102) (110) (111).

#### **4.4.4. RESISTENCIA.**

La resistencia a FLU es debida a una disminución en la permeabilidad de membrana, producida por cambios en los esteroides (66) (112), o bien a un exceso de producción del enzima diana (66) (113) (114).

Se ha descrito resistencia en cepas de *Candida albicans* (115), *Candida glabrata* (102) (116-120) y *Cryptococcus neoformans* (102) (121) (122).

#### **4.4.5. FARMACOCINÉTICA.**

FLU presenta buena absorción oral y penetra bien en el líquido cefalorraquídeo. Su unión a proteínas plasmáticas es del 12% (102) (108) (123) (124).

Las máximas concentraciones encontradas en suero son 4-8 µg/ml tras una dosis de 100 mg (65), y tiene una vida media de 25-30 horas (65). Además, se ha demostrado recientemente que FLU incrementa los niveles de zidovudina en plasma (65) (125).

#### **4.4.6. ADMINISTRACIÓN.**

En el tratamiento de las candidiasis se recomiendan dosis de 50-200 mg/día, dependiendo de la localización de la infección (65). En la meningitis criptocócica, se administran 400 mg/día en pacientes con SIDA, y 200 mg/día como terapia de mantenimiento tras tratamiento con AMB + 5FC (65) (70) (102) (103) (126).



#### 4.4.7. EFECTOS SECUNDARIOS.

Debido a que FLU es mucho más selectivo que KTZ en su afinidad por el citocromo P-450 fúngico frente al de las células de mamífero (102) (103), no afecta a la síntesis de colesterol ni hormonas esteroideas (102) (124) (127) (128).

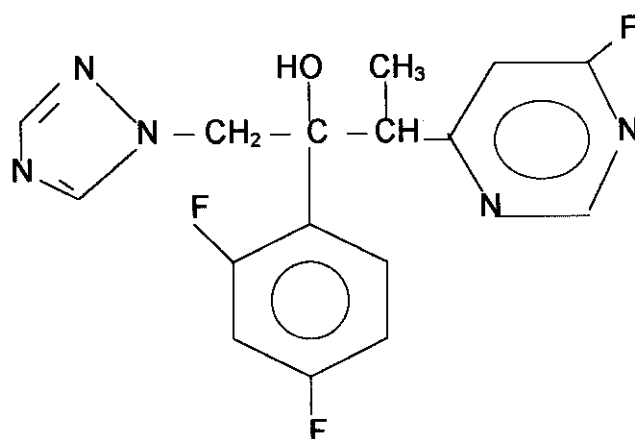
Por otro lado, se han descrito casos de náuseas, anorexia, vómitos y pérdida de cabello, aunque en muy escasa frecuencia (65).

#### 4.5. UK 109.496.

UK 109, 496 (UK) es un nuevo antifúngico monotriazólico, que se encuentra aún en fase de investigación clínica. Su síntesis está orientada fundamentalmente hacia la terapia de la aspergillosis, cuyo agente productor es resistente al fluconazol y es difícil de tratar con el resto de los antifúngicos.

##### 4.5.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.

UK posee una estructura química muy similar a la de FLU, con la diferencia fundamental de que tan sólo posee un anillo triazólico (FIGURA 10).



**FIGURA 10.** Estructura química de la molécula de UK 109,496. Tomado de George D. y cols (129).

#### **4.5.2. ESPECTRO DE ACTIVIDAD.**

Según los datos reunidos en las pruebas de sensibilidad *in vitro* e *in vivo* llevadas a cabo hasta la fecha, UK posee actividad antifúngica frente a *Aspergillus* spp., *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*, de entre las principales levaduras patógenas (129-131).

#### **4.5.3. MECANISMO DE ACCIÓN.**

De la misma manera que KTZ y FLU, UK actúa sobre el citocromo P-450, inhibiendo la síntesis de ergosterol en la membrana plasmática de la célula fúngica (131).

#### **4.5.4. RESISTENCIA.**

Según los resultados de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, UK no genera resistencia en ninguno de las 3 especies fúngicas productoras de las micosis más frecuentes (candidiasis, criptococosis y aspergillosis) (129).

#### **4.5.5. FARMACOCINÉTICA.**

Un estudio llevado a cabo con UK en conejos, revela que el antifúngico posee una vida media en suero de 6 horas. La concentración máxima encontrada para una dosis oral de 10 mg/kg fue de  $1,26 \pm 0,25$  µg/ml (129).

En un ensayo clínico realizado en humanos, y a concentraciones de 2 µg/ml, se observó una unión de UK a proteínas plasmáticas del 58% y una vida media de 6,4 horas (131).

#### **4.5.6. ADMINISTRACIÓN.**

UK es un antifúngico de administración oral e intravenosa, insoluble en agua. Aunque el laboratorio fabricante aconseja disolverlo en HCl, en el estudio citado se utilizó DMSO como disolvente. En los ensayos clínicos llevados a cabo con humanos, se administraron dosis de 0,06-4 mg/kg (131).

#### **4.5.7. EFECTOS SECUNDARIOS.**

En el transcurso de los citados ensayos clínicos, se observaron náuseas, dolor de cabeza, y en algunos casos alteraciones visuales como hipersensibilidad a la luz.

### **5.- SUERO**

El suero es el plasma sanguíneo eliminado tras la retracción del coágulo de sangre. La única diferencia existente entre el suero y el plasma es que en el primero han sido suprimidos el fibrinógeno y gran parte de los factores de coagulación de la sangre (132).

A lo largo de gran número de estudios, se ha demostrado que el suero ocupa un lugar importante en los mecanismos de defensa del hospedador. Además de inhibir el crecimiento de muchos microorganismos (133), puede actuar sinérgicamente con diferentes antimicrobianos (134-139). Por otro lado, el reconocimiento de las bacterias y hongos patógenos por parte de las células fagocíticas requiere la participación de factores séricos, denominados genéricamente **opsoninas**. Entre estas sustancias se encuentran las proteínas constituyentes del sistema del complemento e inmunoglobulinas, entre otros.

Entre las moléculas circulantes en el suero con actividad inmunitaria se encuentra el **complemento**. Consiste en un complejo sistema de 9 proteínas, cuya función es desencadenar y amplificar diversas reacciones inmunitarias. Cuando se activa el primer componente, activa al segundo y se genera una cascada de sucesivas activaciones, la cual induce el comienzo de la función leucocitaria; concretamente, el componente **C5** del complemento es un factor quimiotáctico que induce la movilidad dirigida del PMN (5-7).

Existen otras proteínas séricas implicadas en el mecanismo de la inmunidad: entre las que se encuentran las inmunoglobulinas y la transferrina. Esta última se une al hierro libre e impide que lo capture el microorganismo patógeno, perdiendo éste un componente esencial para su desarrollo.

## 6.- *Cryptococcus neoformans*

*Cryptococcus neoformans* es un hongo levaduriforme patógeno (140) encapsulado que se reproduce principalmente por gemación. La célula es redonda u ovalada, de 4-6 µm de diámetro, que muy raramente forma pseudomicelios.

Las colonias en medio sólido son de aspecto cremoso. Crece a 37°C, aunque también puede hacerlo a 30°C.

### 6.1. CÁPSULA

El factor principal de virulencia de *Cr. neoformans* es su cápsula (141-144). Está compuesta fundamentalmente por un polisacárido, denominado **glucuronoxilomanano**, el cual tiene la propiedad de inhibir la fagocitosis (145-150).

El espesor de la cápsula varía con distintos factores de medio, aumentando proporcionalmente con las concentraciones de CO<sub>2</sub> y suero, y en general cuando las condiciones ambientales son desfavorables para la levadura, sirviéndole de mecanismo de protección (151).

## **6.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.**

### **6.2.1. CRIPTOCOCOSIS PULMONAR.**

*Cr. neoformans* existe de forma natural como saprófito, mayoritariamente en el suelo y excrementos de pichón (140) (152-157).

La vía de entrada del microorganismo en el hombre es normalmente por inhalación (152) (157), tras lo cual pasa a alojarse en los pulmones. Sin embargo, en el individuo sano, la enfermedad suele remitir sin tratamiento, mientras que pueden formarse nódulos (criptococomas) o diseminarse en el inmunodeprimido si no recibe la terapia adecuada.

### **6.2.2. CRIPTOCOCOSIS CUTÁNEA.**

La criptococosis cutánea primaria, normalmente postraumática, suele ser benigna (158). No obstante, la patología secundaria es una manifestación más severa, que suele darse sobre todo en pacientes con SIDA (152) (159) (160).

### **6.2.3. *Cr. neoformans* EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

La meningitis criptocócica constituye una de las principales causas de muerte por micosis en pacientes afectados de SIDA (161) (162). Debido a la tendencia de la levadura a alojarse en áreas del sistema nervioso central, pueden presentarse meningitis y meningoencefalitis (163-169).

### 6.3. TRATAMIENTO.

Las indicaciones terapéuticas en el tratamiento de la meningitis criptocócica, la patología más grave producida por *Cr. neoformans*, son las siguientes:

- **Pacientes sin SIDA.**

AMB (0,3-0,6 mg/kg/día) + 5FC (150 mg/kg/día) **(157) (162) (165).**

- **Pacientes con SIDA.**

La combinación AMB + 5FC puede resultar tóxica en pacientes afectados de SIDA **(162) (170)**. En este caso, se recomienda monoterapia de choque con AMB (0,5 mg/kg) durante 2 meses, seguida de una terapia de mantenimiento con fluconazol (400 mg/kg) **(157).**

## **7.- *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es una de las bacterias que con mayor frecuencia causa infección nosocomial, produciendo una gran variedad de cuadros clínicos **(171-174).**

Este microorganismo no invade la piel sana; sin embargo, cualquier mínima rotura de la barrera cutáneo-mucosa le permite infectar heridas, y su adhesividad a plástico induce la infección de todo tipo de prótesis. Asimismo, la infección local de tejidos puede progresar a estratos más profundos, causando osteomielitis y endocarditis, entre otras patologías **(172).**

Son bacterias aerobias, gram positivas, redondas (0,5-1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro), que pueden aparecer agrupadas. Algunas cepas de *S. aureus* pueden tener cápsula polisacárida, lo que le confiere mayor virulencia (174).

Debido a su relativa facilidad para ser fagocitada, suele utilizarse con frecuencia, junto con *Escherichia coli*, en ensayos con leucocitos PMN.

## ***OBJETIVOS***



Los objetivos del presente estudio han sido los siguientes:

1. Valorar la posible influencia que un antimicrobiano puede ejercer sobre el sistema inmune del hospedador. Para ello, se estudiará el efecto de cinco antifúngicos por separado (anfotericina B, 5 -fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol y UK 109,496) sobre funciones defensivas de los leucocitos PMN (adherencia a plástico y nylon, quimiotaxis, movilidad espontánea, fagocitosis y muerte intracelular).
2. Establecer el efecto que el sistema inmune pueda ejercer sobre la interacción antimicrobiano-microorganismo invasor. En el presente estudio, se valorará la influencia del suero humano normal sobre la actividad fungicida de los fármacos arriba citados frente al hongo levaduriforme patógeno *Cryptococcus neoformans*.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

## 1.- CONDICIONES GENERALES

Como condiciones generales y uniformes en todos los ensayos, se tuvieron en cuenta las siguientes premisas:

1. Los tubos de ensayo en los que se incubaron los leucocitos PMN fueron siempre de polipropileno o poliestireno, o bien vidrio previamente siliconizado, con el fin de evitar la adherencia de las células al vidrio.
2. La esterilización en calor húmedo se llevó a cabo en autoclave (SELECTA AUTESTER-G) a 121 °C 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.
3. Los medios líquidos empleados que así lo requerían se esterilizaron en filtros MILLIPORE de politetrafluoroetileno de 0,22  $\mu$  de diámetro de poro.
4. El pH de los medios y líquidos utilizados en los ensayos con PMN se situó en un rango de 7,2-7,4, con un medidor de pH eléctrico (GIRALT). En dicho rango no se ven alteradas ninguna de las 6 funciones leucocitarias estudiadas (175) (176). Los medios de cultivo de los dos microorganismos utilizados (*S. aureus* y *Cr. neoformans*) se ajustaron a un pH de 7-7,2.
5. En la preparación de los antifúngicos, la solución madre se distribuyó en alícuotas de 1 ml, y se mantuvieron a -20 °C hasta su utilización.

## 2.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### 2.1.- SOLUCIÓN ISOTÓNICA DE CLORURO AMÓNICO (NH<sub>4</sub>Cl)

Se disuelven en 500 ml de agua destilada los siguientes reactivos:

- NH<sub>4</sub>Cl:.....4,16 g
- NaHCO<sub>3</sub>:.....0,42 g.

Tras ajustar el pH (7,2-7,4) y filtrar la solución, se conserva a 4°C hasta su uso.

### 2.2.- SOLUCIÓN SALINA TAMPONADA PARA CÉLULAS HANK'S BALANCED SALT SOLUTION CON GELATINA AL 0,1% (HBSS- G).

Se utiliza esta solución como medio de cultivo para los leucocitos PMN.

Se disuelven en 1 litro de agua destilada estéril los siguientes reactivos:

- NaCl.....8 g
- KCl.....0,4 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O.....0,048 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,06 g
- Glucosa.....1 g
- NaHCO<sub>3</sub>.....0,35 g
- MgSO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O.....0,16 g
- MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O.....0,1 g.

Posteriormente, se añaden a la mezcla 10 ml de gelatina, previamente disuelta y licuada en agua destilada estéril (1 g en 100 ml). Tras una completa

disolución, se procede al ajuste del pH, filtrado y conservación a 4°C hasta su utilización.

### **2.3.- SOLUCIÓN SALINA TAMPONADA (PBS).**

Se disuelven en 1 litro de agua destilada los siguientes compuestos:

NaCl (8 g), KCl (0.12 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,91 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 g)

Tras el ajuste de pH y su esterilización en autoclave, se conserva a 4°C hasta su uso.

### **2.4.- AGUA BÁSICA.**

En 1 litro de agua destilada estéril, se disuelve solución NaOH 10 M (SIGMA) hasta alcanzar un pH de 10,8-11. Se conserva a 4°C hasta su utilización.

### **2.5.- AZUL DE TRIPANO.**

Se disuelven 4 g de colorante en polvo azul de tripano (SIGMA) en 100 ml de agua destilada.

### **2.6.- CALDO DE CULTIVO PARA LEVADURAS bYNB-G.**

#### **2.6.1.- TAMPÓN FOSFATO PARA CALDO bYNB-G.**

En 500 ml de agua destilada se disuelven los siguientes reactivos: (MERCK)

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,165 g  
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,46 g.

Se esteriliza la mezcla en autoclave tras su completa disolución.

### **2.6.2.- CALDO DE CULTIVO bYNB-G.**

En 500 ml de tampón fosfato estéril, se disuelven los siguientes compuestos:

- Medio YNB.....3,35 g
- Glucosa.....5 g
- Cloranfenicol (en polvo).....0,2 g
- Gentamicina (en polvo).....0,02 g.

Tras ajustar el pH a 7,2, se procede a su filtrado y se conserva a 4°C hasta su uso.

## **3.- INFLUENCIA DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE FUNCIONES DE LOS LEUCOCITOS PMN.**

### **3.1.- PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DEL MATERIAL.**

#### **3.1.1.- AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS PMN.**

Para separar los leucocitos PMN del resto de las células sanguíneas se utilizó el método de Eggleton y colaboradores, con algunas modificaciones **(177)** **(178)**.

Se dispensaron 5 ml de sangre venosa, procedente de voluntarios sanos, en tubos con EDTA para evitar su coagulación.

Posteriormente, se añadieron 16 ml de solución isotónica de cloruro amónico ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), y la mezcla se mantuvo a 4°C durante 15 minutos. De esta manera, se lisaron mediante choque osmótico los eritrocitos presentes en la sangre **(177.)**

Transcurrido este tiempo, la solución se sometió a una primera centrifugación a 800 r.p.m. durante 10 minutos, originándose un sedimento de leucocitos PMN. Tras la eliminación del sobrenadante, y para asegurar una completa destrucción de los hematíes, se resuspendió el precipitado en 10 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , manteniéndolo en reposo a 4°C durante 10 minutos. A continuación, el tubo conteniendo la mezcla se centrifugó por segunda vez, a la misma velocidad y tiempo- Una vez más, se extrajo el sobrenadante, y el sedimento de leucocitos se resuspendió en 2 ml de HBSS-G, con objeto de activarlos.

Una vez aislados (su pureza superó siempre el 90%), se procedió al ajuste a la concentración requerida, mediante la cámara de Neubauer.

### 3.1.2.- ANTIFÚNGICOS.

En las pruebas de valoración del efecto de los antifúngicos sobre las funciones de los leucocitos PMN, se emplearon 4 concentraciones de cada uno de los mismos, según se expresa en el siguiente cuadro:

CONCENTRACIONES UTILIZADAS ( $\mu\text{g/ml}$ )					
ANTIFÚNGICOS	SÉRICAS NO TÓXICAS		LÍMITE DE TOXICIDAD	TÓXICAS	
	Valor inferior	Valor superior		Valor inferior	Valor superior
<b>AMB</b>	0,1	1	4	5	50
<b>5FC</b>	5	50	100	100	500
<b>KTZ</b>	0,1	1	5	5	50
<b>FLU</b>	0,1	10	25	25	100
<b>UK</b>	0,1	1	6	5	100

**FIGURA 11.** Concentraciones de antifúngicos empleadas en los ensayos con leucocitos PMN. Las concentraciones que marcan el nivel de toxicidad están tomadas de 131 y de Roilides E y cols (179).

**3.1.2.1.- Anfotericina B.**

El polvo valorado, suministrado por BRISTOL-MYERS SQUIBB, se diluyó en desoxicolato sódico tamponado y agua destilada estéril.

**3.1.2.2.- 5-fluorocitosina.**

El polvo valorado (ROCHE) se diluyó en agua destilada estéril, y se calentó la mezcla a 52°C hasta su completa disolución.

**3.1.2.3.- Ketoconazol.**

A partir del polvo valorado (JANSSEN FARMACÉUTICA), se preparó una solución en dimetilsulfóxido (DMSO).

**3.1.2.4.- Fluconazol.**

El polvo valorado, suministrado por PFIZER, se diluyó en agua destilada estéril.

**3.1.2.5.- UK 109,496.**

Se diluyó primeramente el polvo valorado en ácido clorhídrico (HCl) 0,1M, siguiendo las instrucciones de la empresa farmacéutica (PFIZER).

Posteriormente, se elaboró una segunda y definitiva solución madre disolviendo el polvo en DMSO.



### **3.2.- ENSAYOS CON LEUCOCITOS PMN.**

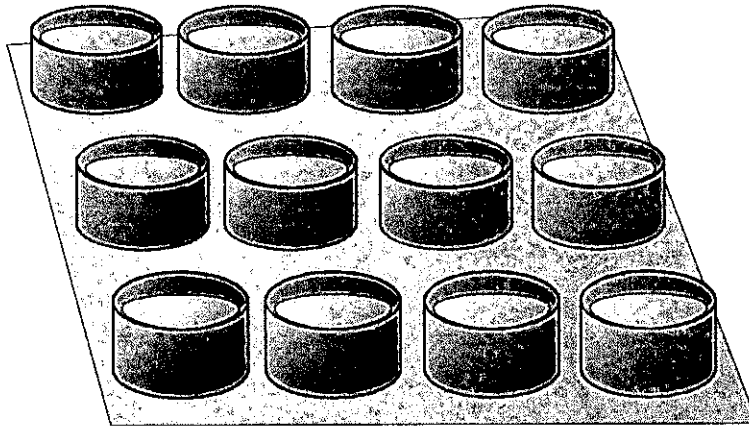
#### **3.2.1.- VIABILIDAD CELULAR.**

Se comprobó mediante el colorante azul de tripano (41) (42), tras los periodos de incubación con cada antifúngico.

#### **3.2.2.- CAPACIDAD DE ADHERENCIA.**

##### **3.2.2.1.- Adherencia a superficies de plástico.**

Se utilizaron placas MIF (STERILIN, GREINER LABOTECHNIK), provistas de 12 pocillos, siguiendo la técnica de De la Fuente (FIGURA 12) (180)



**Figura 12.** Esquema de una placa MIF.

A partir de una solución de leucocitos PMN, aislados y ajustados a  $10^6$  células/ml (se ajusta al doble de la concentración deseada), se dispensaron en cada pocillo alícuotas de 100  $\mu$ l. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l del antifúngico en estudio al doble de la concentración requerida, dispensando cada una de las cantidades utilizadas en un pocillo. Al control se le añadieron 100  $\mu$ l de HBSS-G.

Posteriormente, se incubó la placa durante 30 minutos en estufa al 5% de  $\text{CO}_2$  y 100 de humedad (HERAEUS). Transcurrido este tiempo, se recogieron con cuidado los sobrenadantes de los pocillos y se procedió al conteo de las células presentes, que correspondieron a los leucocitos PMN no adheridos al plástico.

El **ÍNDICE DE ADHERENCIA AL PLÁSTICO** se calculó mediante la expresión (180):

$$I.A.P. = \left( \frac{PMN_i / ml - PMN_f / ml}{PMN_i / ml} \right) \times 100$$

donde  $PMN_i / ml$  = nº de leucocitos PMN iniciales,

$PMN_f / ml$  = nº de leucocitos PMN presentes en el sobrenadante.

#### **2.2.2.2.- Adherencia a fibra de nylon.**

Se siguió el método descrito por McGregor (12), modificado por Rodríguez (181).

Se emplearon pipetas Pasteur, en las que se introdujeron 100 mg de fibra de nylon (DUPONT) hasta una altura constante de 2,5 cm, tras lo cual se esterilizaron las pipetas.

Al mismo tiempo, una solución de leucocitos PMN, previamente aislados y ajustados a la concentración final de  $10^6$  células/ml, se expuso a cuatro

concentraciones diferentes de cada antifúngico, durante 30 minutos en baño de agitación suave (SELECTA UNITRONIC 3200 R) a 37°C. Las muestras de células control se incubaron con HBSS-G, siendo la proporción de leucocitos-antifúngico o HBSS-G de 1:1.

Transcurrido el tiempo, se dejó caer por la columna un volumen de 2 ml de los leucocitos incubados con el antifúngico en estudio; cada columna correspondió a una concentración del fármaco. Se estableció un control con células previamente incubadas con HBSS-G.

Pasados 30 minutos, se recogió el efluente y se agitó con cuidado. A continuación, se contaron los leucocitos PMN presentes, que corresponden a las células que no han quedado adheridas al nylon de la columna.

El **ÍNDICE DE ADHERENCIA A NYLON** se calculó mediante la siguiente fórmula (181):

$$I.A.N. = 100 - \left( \frac{PMN_f / ml}{PMN_i / ml} \right) \times 100$$

donde  $PMN_i$  = nº de leucocitos PMN iniciales

$PMN_f$  = nº de leucocitos PMN recogidos en el efluente.

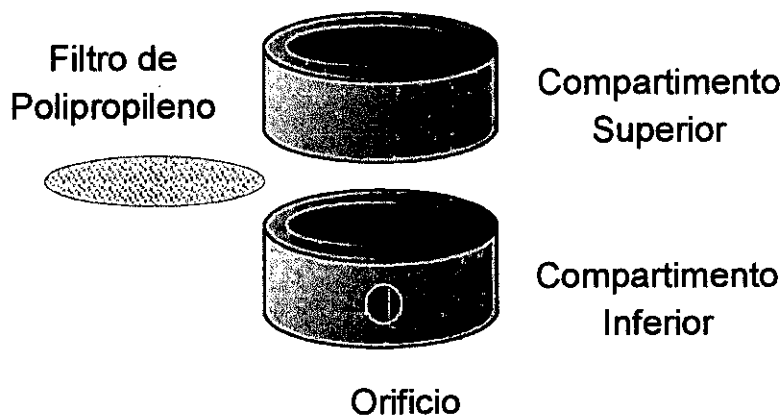
### **3.2.3.- CAPACIDAD DE MOVIMIENTO: QUIMIOTAXIS.**

Para valorar la influencia de los cinco antifúngicos en la movilidad de los leucocitos PMN, se utilizó en método descrito por Boyden (30) y modificado posteriormente por otros autores (182-184).

### 3.2.3.1. Incubación en cámara.

La cámara de Boyden (**FIGURA 13**) consiste en dos compartimentos de polietileno, uno superior y otro inferior, con forma anular. La parte superior posee un diámetro interno de 9 mm, externo de 13 mm y una altura de 5 mm, siendo su capacidad de 0,31 ml. La mitad inferior de la cámara presenta los mismos diámetros que el superior, pero su base es cerrada, confiriéndole forma de recipiente. Su altura externa es de 5 mm y la interna de 4mm, y posee una capacidad de 0,41 ml. El interior del compartimento inferior de la cámara conecta con el exterior mediante un poro de diámetro inferior a 1 mm, situado a media altura.

Entre las dos mitades de la cámara se insertó un filtro de ésteres de nitrocelulosa (MILLIPORE), cuyo tamaño de poro impide la caída de las células por simple gravedad, y únicamente lo pueden atravesar mediante migración activa (**185**). Los filtros utilizados en el presente trabajo fueron de 13 mm de diámetro, 150  $\mu$  de espesor y un tamaño de poro de 3  $\mu$  (SS.WPO.1300). Una vez insertado el filtro entre las subunidades de la cámara, éstas se unieron con un anillo externo de plastilina, dejando libre el orificio del compartimento inferior (**FIGURA 13**).



**Figura 13.** Esquema de la cámara de Boyden.

El quimioatrayente utilizado fue caseína (SIGMA) desnaturalizada. Para desnaturalizarla, se siguió el método de Wilkinson (14), llevando a cabo un viraje brusco de pH a una solución de caseína purificada (5 mg/l) hasta un valor de 12, añadiendo gotas de monofosfato bisódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (SIGMA). Posteriormente, se devolvió a la mezcla a un pH de 7, con la adición de gotas de HCl 0,1 M (SIGMA). Se congeló en alícuotas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Para realizar los experimentos, se rellenó la parte inferior de la cámara con 0,4 ml de quimioatrayente, mediante una jeringuilla y a través del poro externo, de manera que se llenase todo el compartimento y evitando la formación de burbujas. Después se selló el poro con plastilina.

Una vez preparada la cámara y aislados los leucocitos PMN (ajustados finalmente a  $10^6$  células/ml), se incubaron con las diferentes concentraciones del antifúngico en estudio, y en HBSS-G para las células control, en baño de agitación suave a  $37^\circ\text{C}$ . Transcurridos 30 minutos, se añadió a la parte superior de la cámara de Boyden un volumen de 0,3 ml de la suspensión de PMN previamente expuestos al antifúngico o a HBSS-G. Las cámaras se incubaron en estufa de  $\text{CO}_2$  al 5% y 100% de humedad durante 3 horas a  $37^\circ\text{C}$ .

### **3.2.3.2. Fijación y tinción de leucocitos PMN.**

Finalizado el tiempo de incubación, se desmontaron las cámaras y se extrajeron los filtros. A continuación, se llevó a cabo el proceso de fijación-tinción, siguiendo el orden (185):

	REACTIVO	TIEMPO (MINUTOS)
1º	Metanol 5%	5
2º	Etanol 75%	2
3º	Agua destilada	2
4º	Hematoxilina	3
5º	Agua destilada	2
6º	Agua sin destilar	5
7º	Etanol 95%	5
8º	Propanol 98%	5
9º	Propanol + xilol 1:1	5
10º	Xilol puro	5

**FIGURA 14.** Proceso de tinción y fijación de leucocitos PMN.

Una vez teñidos los filtros, se colocaron en un portaobjetos con la cara que estaba orientada a la parte inferior de la cámara hacia arriba. Se contaron, en microscopio óptico con objetivo de inmersión, todas las células observadas al barrer 16 campos al azar. Así, el **ÍNDICE DE QUIMIOTAXIS** representa el número total de leucocitos PMN detectados en 16 campos al azar en la cara inferior del filtro, y cuantifica las células que han migrado a través del filtro durante 3 horas **(182)**.

#### **3.2.4. CAPACIDAD DE MOVIMIENTO: MOVILIDAD ESPONTÁNEA.**

Los ensayos que midieron la movilidad espontánea de los leucocitos en presencia de antifúngico se desarrollaron de manera idéntica a los de quimiotaxis, con las siguientes salvedades:

- El poro del filtro fue de mayor diámetro (8  $\mu$ ) (SC.WPO.1300).
- Se utilizó solución HBSS-G en lugar de quimioatrayente en el compartimento inferior de la cámara de Boyden.

### **3.2.5. CAPACIDAD MICROBICIDA: FAGOCITOSIS.**

Para los experimentos de fagocitosis y muerte intracelular con leucocitos PMN, se siguió el método descrito por Van Furth, con algunas modificaciones **(20) (43) (186)**.

Para valorar el efecto de los cinco antifúngicos sobre la capacidad microbica de los leucocitos PMN, se utilizaron además suero humano y la bacteria *Staphylococcus aureus*.

#### **3.2.5.1. Suero humano.**

El suero se extrajo a partir de sangre procedente de voluntarios sanos. Se elaboró una solución mezcla con suero de distintos donantes de la cual, tras centrifugarse a 3500 r.p.m. durante 10 minutos, se separó el sobrenadante y se congeló en viales a -20°C hasta su utilización.

#### **3.2.5.2. Microorganismo.**

Para los ensayos de fagocitosis y muerte intracelular, se utilizó la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

La cepa se cultivó en placas de agar Müller-Hinton, a partir de las cuales se realizaron subcultivos cada 24 horas. Se preparó un medio de cultivo en caldo Müller-Hinton en agitador orbital (SELECTA) a 150 o.p.m. Tras alcanzar la bacteria la fase exponencial de crecimiento, se centrifugó y resuspendió en medio HBSS-G, ajustándose por espectrofotometría a  $2 \times 10^6$  células/ml, es decir, una proporción de 2:1 respecto a los leucocitos PMN.

Se dispensaron en 4 tubos suspensiones con un volumen final de 1 ml, conteniendo diferentes concentraciones de cada antifúngico, *S. aureus*, suero humano al 10% y leucocitos PMN, distribuidos de la siguiente manera:

	<i>S. aureus</i> ( $\mu$ l)	SUERO( $\mu$ l)	PMN ( $\mu$ l)	HBSS-G ( $\mu$ l)
CONTROL	400	-	-	600
CONTROL+SUERO	400	100	-	500
CONTROL+SUERO+PMN	400	100	400 <sub>c</sub>	100
TRATADOS+SUERO+PMN	400	100	400 <sub>T</sub>	100

**FIGURA 15.** Distribución de las muestras del ensayo de antifúngicos con suero y leucocitos PMN.

donde 400<sub>T</sub> son leucocitos PMN expuestos previamente a concentraciones del antifúngico en estudio, y 400<sub>c</sub> son leucocitos PMN no tratados.

Todos los tubos se incubaron en baño de agitación suave a 37°C durante 90 minutos, tras lo cual se detuvo el proceso de fagocitosis añadiendo a cada muestra 500  $\mu$ l de solución HBSS-G a 4°C, con objeto de inactivar los leucocitos PMN. A continuación, los tubos se centrifugaron a baja velocidad (700 r.p.m.) durante 10 minutos, con el fin de que las bacterias que se encontrasen en el interior de los leucocitos se hundieran con éstos en la parte inferior del tubo. El sobrenadante, compuesto de bacterias no fagocitadas, se diluyó en solución salina tamponada estéril (PBS), y se sembró en placas de agar Müller-Hinton. Dichas placas se incubaron en estufa a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se contaron las colonias, correspondientes a células bacterianas no muertas por los leucocitos PMN.

El **ÍNDICE DE FAGOCITOSIS** se calculó mediante la siguiente fórmula

(43):

$$I.F. = \left( \frac{UFC_T / ml - UFC_C / ml}{UFC_C / ml} \right) \times 100$$



donde  $UFC_C/ml$  = Unidades Formadoras de Colonias/ml presentes en el tubo  
**Control + suero**, y  
 $UFC_T/ml$  = Unidades Formadoras de Colonias/ml presentes en los tubos  
**Tratados + suero**.

### **3.2.6.- CAPACIDAD MICROBICIDA: MUERTE INTRACELULAR.**

La técnica empleada fue la misma que para los experimentos de fagocitosis, si bien no se detuvo el proceso mediante HBSS-G, sino que se prepararon alícuotas de cada tubo en solución de agua básica a pH 11, para lisar los PMN (43). De esta manera, las bacterias vivas que pudieran contener salieron al medio, el cual se sembró en placas de agar Müller-Hinton. A partir de aquí, se procedió de la misma manera que en los ensayos de fagocitosis.

## **4.- INFLUENCIA DEL SUERO EN LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A *Cryptococcus neoformans*.**

### **4.1.- MICROORGANISMO.**

Se utilizó el hongo levaduriforme *Cryptococcus neoformans* CECT 1078. A partir de placas de agar Sabouraud Dextrosa (BIO-MERIEUX), se incubaron subcultivos en estufa cada 48 horas. Para todos los ensayos se utilizó un tamaño de inóculo de  $1$  a  $5 \times 10^3$  células/ml.

### **4.2.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS.**

Para medir el grado de sensibilidad de *Cr. neoformans* frente a cada uno de los cinco antifúngicos del estudio, se determinó la concentración de fármaco que

inhibió el 90% del crecimiento de la levadura (**IC<sub>90</sub>**) (**187**). Para ello, se siguieron las normas del NCCLS, con la salvedad de que el medio de cultivo líquido utilizado fue bYNB-G (**188**).

La concentración inhibitoria de antifúngico se calculó, a partir de los datos obtenidos por espectrofotometría, como la concentración más baja de quimioterápico que cumplió el criterio:

$$\%T > [\%T_c + N(100 - \%T_c)]$$

donde:

**%T<sub>c</sub>** = porcentaje de transmisión del haz luminoso de los tubos **Control** (libres de antifúngico), y

**N** = fracción de inhibición, que se define como una función de la turbidez en los tubos control (**187**).

4.3. CINÉTICA DE MUERTE.

Partiendo de un cultivo de *Cr. neoformans* en caldo YNB-G, mantenido a 37°C en agitación orbital (150 o.p.m.), y en fase exponencial de crecimiento, se ajustó a una concentración final de 10<sup>3</sup> células/ml. A continuación, se procedió al siguiente reparto, siendo el volumen final de 5 ml y teniendo en cuenta que el porcentaje de suero en los tubos que lo llevaban fue del 10% (**145**) (**189**):

	<i>Cr. neoformans</i> (ml)	SUERO (ml)	ANTIFÚNGICO (ml)	bYNB-G (ml)
CONTROL	2,5	-	-	2,5
CONTROL+SUERO	2,5	0,5	-	2
TRATADO	2,5	-	2,5	-
TRATADO+SUERO	2,5	0,5	2	-

**FIGURA 16.** Distribución de las muestras para los ensayos con *Cr. neoformans*, suero y antifúngicos.

Todas las muestras se mantuvieron a 37°C en agitación orbital durante 72 horas. Cada 12 horas se sembraron alícuotas diluidas en PBS de cada tubo en placas de agar Sabouraud, las cuales se incubaron en estufa a 37°C. Transcurridas 48 horas, se contaron las colonias y se realizó el análisis estadístico de los datos.

#### **4.4.- PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO.**

El porcentaje de inhibición del crecimiento (IC) se calculó mediante la siguiente fórmula (190):

$$\%I_C = 1 - \left( \frac{UFC_T/ml}{UFC_C/ml} \right) \times 100$$

donde:

UFC<sub>T</sub>/ml = levaduras tratadas con el antifúngico, y

UFC<sub>C</sub>/ml = levaduras no tratadas.

Para las curvas en las que intervino el suero:

$$\%I_C = 1 - \left( \frac{UFC_{TS}/ml}{UFC_{CS}/ml} \right) \times 100$$

donde:

UFC<sub>TS</sub>/ml = levaduras tratadas con el antifúngico y suero, y

UFC<sub>CS</sub>/ml = levaduras no tratadas con antifúngico pero sí con suero.

#### **4.5.- PORCENTAJE DE MUERTE.**

Cuando el número de UFC/ml fue menor que el del inóculo inicial, se determinó el porcentaje de muerte (%M), según la fórmula (190):

$$\%M = 1 - \left( \frac{UFC_T/ml}{UFC_I/ml} \right) \times 100$$

donde:

$UFC_T/ml$  = levaduras tratadas con el antifúngico, y

$UFC_I/ml$  = tamaño de inóculo inicial.

Para las curvas en las que intervino el suero:

$$\%M = 1 - \left( \frac{UFC_{TS}/ml}{UFC_I/ml} \right) \times 100$$

donde:

$UFC_{TS}/ml$  = levaduras tratadas con el antifúngico y suero, y

$UFC_I/ml$  = tamaño de inóculo inicial.

## 5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En relación con la metodología estadística, en este trabajo se ha llevado a cabo, tanto en los ensayos con PMN como los experimentos con suero, un estudio meramente descriptivo sobre cada una de las muestras recogidas a diferentes concentraciones de los antifúngicos, calculando como valores típicos representativos la **media aritmética** y la **desviación estándar**.

A partir de dichos valores, se realizó un estudio inferencial, que consistió en establecer la significación estadística entre ellos mediante el test no paramétrico del **Análisis de la Varianza de una vía**, en su modalidad **“múltiples comparaciones frente a un control”**, pues el tamaño muestral disponible hace de este método estadístico el más apropiado.

Con los resultados obtenidos en los ensayos en los que intervinieron los leucocitos PMN, se realizaron tests de ANOVA para comparar los datos procedentes de muestras tratadas con antifúngico con respecto a un control. Se

consideró que las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando la probabilidad de que se debieran al azar fue  $p < 0,01$ .

Por otra parte, se calcularon las rectas de regresión lineal de los ensayos, junto con el parámetro  $r$ , con el fin de establecer en cada función estudiada la existencia o no de concentración-dependencia durante el tratamiento de los leucocitos PMN con cada antifúngico. Según los resultados obtenidos en los ensayos realizados con antifúngicos y leucocitos PMN, hemos clasificado los efectos de los antifúngicos sobre las funciones leucocitarias como **concentración-dependientes**, si la variación experimentada por la actividad de las células fue proporcional (directa o inversamente) significativamente a la concentración de fármaco utilizada. Las variaciones fueron **concentración-independientes**, si dicha proporcionalidad no existió o no fue estadísticamente significativa.

Con respecto a los datos obtenidos en las curvas de letalidad, las comparaciones llevadas a cabo fueron las siguientes:

- 1.- Se valoró si los resultados obtenidos en las muestras que contenían únicamente antifúngico fueron diferentes significativamente o no ( $p < 0,01$ ) de los procedentes de muestras control.
- 2.- Asimismo, se evaluó la significación estadística existente entre los resultados procedentes de muestras con antifúngico y suero con respecto a los controles en los que el suero estaba presente.
- 3.- Por último, se llevó a cabo un análisis para establecer la significación estadística en las diferencias encontradas entre las muestras que contenían antifúngico y suero y las que sólo poseían antifúngico.

El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del programa informático EPISTAT.

## ***RESULTADOS***

## **1.-EFECTO DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LAS FUNCIONES DE LOS LEUCOCITOS PMN.**

En las tablas que se exponen a continuación, se expresan los valores obtenidos en los distintos índices estudiados, con las diferentes concentraciones de cada uno de los antifúngicos empleados en las pruebas. Asimismo, se indican los resultados encontrados tras la aplicación del test de ANOVA a los índices obtenidos.

Las gráficas corresponden a la representación de los valores porcentuales de los índices absolutos, dando el valor de 100 a los encontrados en las muestras control.

La viabilidad de los PMN antes de los ensayos y tras la incubación con cualquiera de los antifúngicos se mantuvo constante, y fue siempre superior al 90% (TABLA I).

### **1.1.- ANFOTERICINA B**

#### **1.1.1.- CAPACIDAD DE ADHERENCIA**

##### **1.1.1.1.- Adherencia al plástico (TABLA II) (FIGURA 17 A).**

AMB no modificó de forma estadísticamente significativa la capacidad de adherencia a la placa MIF, si bien indujo un ligero incremento en los índices con las concentraciones de 1 y 5 µg/ml.

#### **1.1.1.2.- Adherencia al nylon (TABLA II) (FIGURA 17 B).**

Los índices de adherencia a la fibra de nylon se vieron incrementados significativamente cuando se expusieron los neutrófilos a 50 µg/ml de AMB. El resto de las concentraciones estudiadas no alteraron significativamente los valores obtenidos en las muestras control.

#### **1.1.2.- CAPACIDAD DE MOVIMIENTO.**

##### **1.1.2.1.- Movilidad espontánea (TABLA II) (FIGURA 18 A).**

AMB (50 µg/ml) disminuyó significativamente la movilidad espontánea de los PMN. Las concentraciones intermedias del antifúngico también alteraron negativamente, aunque de forma no significativa, el índice de movilidad espontánea.

##### **1.1.2.2.- Quimiotaxis (TABLA II) (FIGURA 18 B).**

Al igual que la movilidad espontánea, la quimiotaxis de los PMN tratados con AMB se vio disminuida de manera inversamente proporcional al incremento de la concentración del antifúngico, aunque únicamente los ensayos con 5 y 50 µg/ml mostraron significación estadística.

#### **1.1.3.- CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y PODER MICROBICIDA.**

##### **1.1.3.1.- Fagocitosis (TABLA II) (FIGURA 19 A).**

Los índices de fagocitosis de los neutrófilos tratados con 50 µg/ml de AMB disminuyeron significativamente. Las demás concentraciones no indujeron ninguna modificación, si bien se observó un incremento no significativo en la función fagocítica de las células expuestas a 1 µg/ml de AMB.



### **1.1.3.2.- Muerte intracelular (TABLA II) (FIGURA 19 B).**

AMB modificó negativamente la capacidad microbicida de los PMN, a concentraciones tóxicas y en el límite de toxicidad, induciendo un descenso en los índices de muerte intracelular al aumentar la concentración de antifúngico. La funcionalidad de los PMN en el aspecto de la muerte bacteriana se vio prácticamente anulada cuando fueron tratados con 5 y 50 µg/ml de AMB.

## **1.2.- 5-FLUOROCITOSINA.**

### **1.2.1.- CAPACIDAD DE ADHERENCIA.**

#### **1.2.1.1.- Adherencia al plástico (TABLA III) (FIGURA 20 A).**

Los índices de adherencia de los PMN a la placa MIF no se vieron alterados significativamente por la presencia de 5FC.

#### **1.2.1.2.- Adherencia al nylon (TABLA III) (FIGURA 20 B).**

Aunque los PMN tratados con 100 y 500 µg/ml mostraron un ligero incremento en su capacidad de adherencia a la fibra de nylon, 5FC no alteró de manera significativa dicha función leucocitaria.

### **1.2.2.- CAPACIDAD DE MOVIMIENTO.**

#### **1.2.2.1.- Movilidad espontánea (TABLA III) (FIGURA 21 A).**

Los índices de movilidad espontánea de los leucocitos expuestos a 5FC sólo aumentaron ligeramente con la máxima concentración del antifúngico (500 µg/ml), y de forma no significativa.

#### **1.2.2.2.- Quimiotaxis (TABLA III) (FIGURA 21 B).**

5FC produjo un pequeño descenso en la capacidad quimiotáctica de los PMN, inversamente proporcional a la concentración de antifúngico, aunque sin significación estadística.

#### **1.2.3.- CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y PODER MICROBICIDA.**

##### **1.2.3.1.- Fagocitosis (TABLA III) (FIGURA 22 A).**

La función fagocítica de los leucocitos PMN estudiados únicamente se vio incrementada en las células tratadas con 50 µg/ml, y disminuyó en las expuestas a 500 µg/ml de 5FC, ambas de forma no significativa.

##### **1.2.3.2.- Muerte intracelular (TABLA III) (FIGURA 22 B).**

Los índices de muerte intracelular de los neutrófilos se movieron en un rango muy similar cuando las células se trataron con 5FC. Tan sólo se observó una ligera variación negativa, no significativa, en los PMN expuestos a 50 µg/ml.

#### **1.3.- KETOCONAZOL.**

##### **1.3.1.- CAPACIDAD DE ADHERENCIA.**

##### **1.3.1.1.- Adherencia al plástico. (TABLA IV) (FIGURA 23 A).**

Los índices de adherencia al plástico de los leucocitos PMN no se vieron modificadas significativamente con ninguna de las 4 concentraciones de KTZ estudiadas.

### **1.3.1.2.- Adherencia al nylon (TABLA IV) (FIGURA 23 B).**

La adherencia a fibra de nylon experimentó un descenso en los leucocitos tratados con 5 µg/ml de KTZ, mientras que la adhesividad aumentó en aquellos neutrófilos que se expusieron a 500 µg/ml. Sin embargo, ninguna de las dos modificaciones tuvo significación estadística.

### **1.3.2.- CAPACIDAD DE MOVIMIENTO.**

#### **1.3.2.1.- Movilidad espontánea (TABLA IV) (FIGURA 24 A).**

La movilidad espontánea de los leucocitos PMN tratados con 1 µg/ml de KTZ experimentó un ligero ascenso, no significativo. No obstante, la mayor alteración de esta función la sufrieron las células tratadas con 5 y 50 µg/ml de KTZ, las cuales mostraron un descenso significativo en su movilidad.

#### **1.3.2.2.- Quimiotaxis (TABLA IV) (FIGURA 24 B).**

Esta función resultó disminuida drásticamente en los neutrófilos que se mezclaron con KTZ. El descenso fue generalizado a partir de 1 µg/ml, significativo en las células expuestas a 5 y 50 µg/ml y máximo en esta última concentración, en la que la quimiotaxis de los PMN correspondientes fue nula.

### **1.3.3.- CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y PODER MICROBICIDA.**

#### **1.3.3.1.- Fagocitosis (TABLA IV) (FIGURA 25 A).**

Los índices de fagocitosis de los leucocitos PMN no se vieron modificados significativamente con ninguna de las concentraciones de KTZ estudiadas.

### **1.3.3.2.- Muerte intracelular (TABLA IV) (FIGURA 25 B).**

La función microbicida de los leucocitos PMN tratados con 5 µg/ml de KTZ experimentó un ligero ascenso, para volver a descender por debajo de los valores observados en las células control en los leucocitos expuestos a la máxima concentración (50 µg/ml). En ningún caso se observó significación estadística.

## **1.4.- FLUCONAZOL.**

### **1.4.1.- CAPACIDAD DE ADHERENCIA.**

#### **1.4.1.1.- Adherencia al plástico (TABLA V) (FIGURA 26 A).**

Los valores observados en las pruebas de adherencia a placa MIF en los neutrófilos tratados con FLU mostraron una ausencia de variación en todas las concentraciones, oscilando entre unos rangos muy similares,

#### **1.4.1.2.- Adherencia al nylon (TABLA V) (FIGURA 26 B).**

En general, FLU indujo un ligero incremento en la adhesividad de los PMN a la fibra de nylon, proporcional al aumento de la concentración del antifúngico. Dicha modificación no fue estadísticamente significativa.

### **1.4.2.- CAPACIDAD DE MOVIMIENTO.**

#### **1.4.2.1.- Movilidad espontánea (TABLA V) (FIGURA 27 A).**

Al igual que las funciones anteriores, FLU no alteró significativamente los índices de movilidad espontánea de los PMN estudiados, si bien con 100 µg/ml la movilidad de los neutrófilos sufrió un ligero descenso.

#### **1.4.2.2.- Quimiotaxis (TABLA V) (FIGURA 27 B).**

La quimiotaxis de los PMN tratados con FLU no experimentó variación alguna, aunque se observó, al igual que en la movilidad espontánea, una pequeña disminución de la capacidad quimiotáctica de las células tratadas con la máxima concentración (100 µg/ml).

#### **1.4.3.- CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y PODER MICROBICIDA.**

##### **1.4.3.1.- Fagocitosis (TABLA V) (FIGURA 28 A).**

FLU no incrementó ni mermó de forma significativa la función fagocítica de los neutrófilos tratados con el antifúngico a ninguna de las concentraciones ensayadas.

##### **1.4.3.2.- Muerte intracelular (TABLA V) (FIGURA 28 B).**

Al igual que lo observado en la fagocitosis, la capacidad microbicida de los PMN tratados con FLU no sufrió variación alguna, oscilando los 4 índices en un rango muy similar al control.

#### **1.5.- UK 109,496.**

##### **1.5.1. CAPACIDAD DE ADHERENCIA.**

##### **1.5.1.1.- Adherencia a plástico (TABLA VI) (FIGURA 29 A).**

Este antifúngico azólico de nueva síntesis no indujo ninguna variación en los índices de adherencia al plástico de las células tratadas con respecto a los controles.

**1.5.1.2.- Adherencia al nylon (TABLA VI) (FIGURA 29 B).**

La adherencia a la fibra de nylon únicamente resultó disminuida, y no significativamente, en los PMN tratados con 0,1 µg/ml de UK.

**1.5.2.- CAPACIDAD DE MOVIMIENTO.****1.5.2.1.- Movilidad espontánea (TABLA VI) (FIGURA 30 A).**

UK indujo un descenso progresivo de los índices de movilidad espontánea de los leucocitos PMN, aunque dicha disminución únicamente fue significativo en los neutrófilos tratados con 100 µg/ml del antifúngico.

**1.5.2.2.- Quimiotaxis (TABLA VI) (FIGURA 30 B).**

La quimiotaxis de los PMN tratados con 100 µg/ml de UK experimentó un descenso significativo. La disminución en la función quimiotáctica de los neutrófilos tratados con concentraciones menores fue menos clara.

**1.5.3.- CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y PODER MICROBICIDA.****1.5.3.1.- Fagocitosis (TABLA VI) (FIGURA 31 A).**

De un ligero incremento en la función fagocítica de los PMN tratados con 0,1 µg/ml de UK; se llegó a una progresiva disminución de los valores de los índices de fagocitosis con las concentraciones mayores, aunque en ningún caso con significación estadística.

### 1.5.3.2.- Muerte intracelular (TABLA VI) (FIGURA 31 B).

Los índices de muerte intracelular de los PMN tratados con 100 µg/ml de UK experimentaron un ligero ascenso, no significativo, mientras que el resto de las concentraciones no modificaron la capacidad microbicida.

## 1.6.- MECANISMOS DE ACCIÓN TOXICOLÓGICA.

En la **TABLA VII** se refleja la actividad de todos los antifúngicos frente a las funciones leucocitarias estudiadas, atendiendo al criterio de concentración dependencia marcado por el parámetro *r*. Se puede observar cómo únicamente actuaron de manera concentración independiente en la totalidad de la función leucocitaria 5FC y FLU, mientras que AMB mostró su efecto de forma concentración dependiente en todas las funciones exceptuando la adherencia a plástico. KTZ y UK influyeron en la movilidad leucocitaria (movilidad espontánea y quimiotaxis), ambos de forma concentración dependiente.

## 2.-EFECTO DEL SUERO SOBRE LA ACCIÓN FUNGICIDA DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE *Cryptococcus neoformans*.

En todas las curvas de letalidad obtenidas, se observó como constante que el crecimiento de las levaduras tratadas únicamente con suero fue en todo momento muy inferior del de las levaduras control.

## 2.1.- ANFOTERICINA B

### 2.1.1.- IC<sub>90</sub>.

La IC<sub>90</sub> de AMB frente a *Cr. neoformans* fue de 0,125 µg/ml (TABLA VIII).

### 2.1.2.- CURVA DE LETALIDAD (FIGURA 32).

AMB, a la concentración de 0,125 µg/ml, mostró un efecto fungicida frente a *Cr. neoformans* hasta la hora 48 de crecimiento de la levadura. A partir de este momento, se observó una recuperación del mismo. La diferencia con respecto al control fue estadísticamente significativa en todas las horas.

Al añadirle el 10 % de suero, se observó que las levaduras crecían por encima de las que no lo llevaban. Comparando ambos crecimientos, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas a partir de la hora 24.

Cuando *Cr. neoformans* se trató con 4 µg/ml de AMB, se observó un descenso en la curva de crecimiento durante todo el tiempo que duró el experimento, con significación estadística a lo largo de las 72 horas. Sin embargo, la bajada fue menor al añadirle el suero. Las diferencias observadas entre ambas curvas fueron significativas a partir de la hora 36, al igual que lo obtenido con respecto a las levaduras expuestas únicamente al suero.

### 2.1.3.- TASA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (TABLA IX).

En todas las muestras se observó un aumento a lo largo del tiempo, que llegó al 100% en el caso de las levaduras tratadas con 4 µg/ml. Sin embargo, los valores observados en las levaduras a las que se añadió suero fueron menores que aquellas que únicamente se expusieron a AMB.



#### **2.1.4.- TASA DE MUERTE (TABLA X).**

Se obtuvieron tasas de muerte por encima de 0 en las muestras tratadas con 0,125 y con 4 µg/ml a partir de las horas 24 y 12 del crecimiento, respectivamente. En todo momento se observaron tasas de muerte igual a 0 en las levaduras tratadas con suero y antifúngico.

### **2.2.- 5-FLUOROCITOSINA.**

#### **2.2.1.- IC<sub>90</sub>.**

La IC<sub>90</sub> de 5FC frente a *Cr. neoformans* fue de 64 µg/ml (TABLA VIII).

#### **2.2.2.- CURVA DE LETALIDAD (FIGURA 33).**

En las curvas de letalidad obtenidas al tratar *Cr. neoformans* con 5FC, se observó una inhibición del crecimiento significativo y concentración-dependiente. Al añadir el suero, no se experimentaron variaciones significativas con respecto a las levaduras que no lo llevaban.

#### **2.2.3.- TASA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (TABLA XI).**

Las tasas de inhibición del crecimiento reflejaron un aumento progresivo a medida que se incrementó la concentración de 5FC. No obstante, al añadir el suero a las muestras tratadas, se obtuvieron valores inferiores con respecto a los resultados correspondientes a las levaduras expuestas únicamente a 5FC.

#### **2.2.4.- TASA DE MUERTE (TABLA XII).**

Se obtuvieron tasas de muerte diferentes de 0 únicamente en las levaduras tratadas con 100 µg/ml de 5FC, a partir de la hora 24; hasta la hora 72, estos valores experimentaron fluctuaciones positivas y negativas.

## **2.3.- KETOCONAZOL.**

### **2.3.1.- IC<sub>90</sub>.**

La IC<sub>90</sub> de KTZ frente a *Cr. neoformans* fue de 1 µg/ml (TABLA VIII).

### **2.3.2.- CURVA DE LETALIDAD (FIGURA 34).**

En la cinética de crecimiento de las levaduras tratadas con 1 y 4 µg/ml de KTZ se observó un enorme descenso, significativo a lo largo del tiempo, con respecto a las muestras control. Al añadirles suero, el crecimiento del hongo fue significativamente superior (a partir de la hora 24 de crecimiento) al de las levaduras que no lo llevaban.

### **2.3.3.- TASA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (TABLA XIII).**

Los tasas de inhibición del crecimiento obtenidas fueron, llegaron incluso al 100% en ambas concentraciones a la hora 72 del crecimiento. Los valores fueron algo menores en las levaduras tratadas con suero y antifúngico.

### **2.3.4.- TASA DE MUERTE (TABLA XIV).**

Los tasas de muerte obtenidos únicamente fueron distintos de 0 en las muestras tratadas con ambas concentraciones de KTZ, a partir de la hora 24, así como en las que, además, llevaban suero, a partir de la hora 60 (1 µg/ml KTZ) y 72 (4 µg/ml KTZ).

## **2.4.- FLUCONAZOL.**

### **2.4.1.- IC<sub>90</sub>.**

La IC<sub>90</sub> de FLU frente a *Cr. neoformans* fue de 16 µg/ml (TABLA VIII).

#### **2.4.2.- CURVA DE LETALIDAD (FIGURA 35).**

Las curvas de letalidad obtenidas al tratar *Cr. neoformans* con 16 y 32 µg/ml de FLU reflejan un descenso significativo (horas 24-72) en el crecimiento de la levadura, proporcional a la concentración de antifúngico utilizada. Al añadir suero, se observó asimismo una disminución en el crecimiento significativa con respecto a las levaduras sin FLU (horas 36-72) y a las que sólo se trataron con FLU (horas 36-72), aunque dicho descenso fue menos acusado en este último caso.

#### **2.4.3.- TASA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (TABLA XV).**

Las tasas de inhibición del crecimiento se incrementaron a medida que se aumentó la concentración de FLU y el tiempo transcurrido. Al añadir suero a las levaduras, los valores fueron menores.

#### **2.4.4.- TASA DE MUERTE (TABLA XVI).**

Las tasas de muerte fueron distintas de 0 a partir de la hora 36, salvo en las levaduras tratadas con 16 µg/ml y suero (hora 72), y en la hora 48 del crecimiento del hongo expuesto a 32 µg/ml de FLU y suero.

### **2.5.- UK 109,496.**

#### **2.5.1.- IC<sub>90</sub>.**

La IC 90 de UK frente a *Cr. neoformans* fue de 0,125 µg/ml (TABLA VIII).

#### **2.5.2.- CURVA DE LETALIDAD (FIGURA 36).**

La cinética de crecimiento de *Cr. neoformans* tratado con 0,125 µg/ml de UK mostró un descenso moderado y significativo a partir de la hora 24. En las levaduras

expuestas a 4  $\mu\text{g/ml}$ , la disminución en el crecimiento fue más acusada y significativa en todas las horas.

Las muestras tratadas con la concentración más baja a las que se añadió suero, se observó un descenso en el crecimiento casi inapreciable, no significativo hasta la hora 48, respecto a las levaduras tratadas con suero y sin antifúngico, y significativo en las horas 60-72 respecto a las muestras tratadas únicamente con el antifúngico.

La curva correspondiente a las levaduras tratadas con 4  $\mu\text{g/ml}$  de UK y suero mostró un descenso mayor que la anterior, aunque inferior a la correspondiente a las levaduras expuestas sólo al antifúngico. Se observaron diferencias significativas entre dicha curva y la correspondiente a las levaduras tratadas únicamente con suero en las horas 48-72, y también a partir de la hora 24 con respecto a las levaduras expuestas a 4  $\mu\text{g/ml}$  de UK sin suero.

#### **2.5.3.- TASA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (TABLA XVII).**

En las tasas de inhibición del crecimiento, se observó un aumento directamente proporcional al tiempo y a la concentración de UK utilizada. Los valores fueron inferiores en las levaduras que llevaban suero además del quimioterápico.

#### **2.5.4.- TASA DE MUERTE (TABLA XVIII).**

Se obtuvieron valores superiores a 0 en las muestras tratadas con 0,125  $\mu\text{g/ml}$  de UK a partir de la hora 60, así como en las expuestas a 4  $\mu\text{g/ml}$  a partir de la hora 24. Las tasas de muerte fúngica correspondientes a las levaduras expuestas a suero, además de antifúngico, únicamente fueron superiores a 0 en las levaduras tratadas con 4  $\mu\text{g/ml}$  (horas 60-72).

# ***TABLAS Y FIGURAS***

ANTIFÚNGICOS	RANGO DE VIABILIDAD (%)
Anfotericina B	91-94
5-fluorocitosina	93-98
Ketoconazol	94-97
Fluconazol	93-96
UK 109,496	95-98

**TABLA I.** Efecto de 4 concentraciones anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol y UK 109,496, sobre la viabilidad celular de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos humanos. Los datos representan el porcentaje de viabilidad en el conjunto de las concentraciones estudiadas de cada antifúngico.

AMB ( $\mu\text{g/ml}$ )	I.A.P.	I.A.N.	I.M.E.	I.Q.	I.F.	I.M.I.
Control	81,1 $\pm$ 10,1	40 $\pm$ 11,3	86,6 $\pm$ 23,5	73,1 $\pm$ 24,9	56,3 $\pm$ 4,7	23,2 $\pm$ 15,1
0,1	77 $\pm$ 4,4	44 $\pm$ 9,8	63 $\pm$ 11,1	67,8 $\pm$ 25,8	63,3 $\pm$ 10,2	23 $\pm$ 19,4
1	88,2 $\pm$ 5,7	49 $\pm$ 5,6	70,3 $\pm$ 15,8	55 $\pm$ 28	71,3 $\pm$ 11,5	18,7 $\pm$ 19,7
5	85,3 $\pm$ 12,6	55 $\pm$ 5,6	53,6 $\pm$ 19,8	33 $\pm$ 17,6*	54,3 $\pm$ 6,02	4,2 $\pm$ 8,5*
50	81,3 $\pm$ 7,3	80 $\pm$ 7,07*	5,3 $\pm$ 2,5*	20,8 $\pm$ 22*	21 $\pm$ 6,5*	0,3 $\pm$ 0,5*

**TABLA II.** Efecto de 4 concentraciones de anfotericina B sobre 6 funciones de los leucocitos polimorfonucleares. Los resultados se expresan como la media aritmética de 10 experimentos  $\pm$  la desviación típica, (I.A.P.= Índice de Adherencia al Plástico; I.A.N.= Índice de Adherencia al Nylon; I.M.E.= Índice de Movilidad Espontánea; I.Q. = Índice de Quimiotaxis; I.F.= Índice de Fagocitosis; I.M.I. = Índice de Muerte Intracelular. (\*) indica que los resultados obtenidos fueron significativamente distintos a las muestras control, tras aplicarles el test de ANOVA ( $p < 0,01$ ).

5FC ( $\mu\text{g/ml}$ )	I.A.P.	I.A.N.	I.M.E.	I.Q.	I.F.	I.M.I.
Control	89 $\pm$ 1,4	37,9 $\pm$ 11,8	70 $\pm$ 0	63,8 $\pm$ 14,1	58 $\pm$ 6,24	36,6 $\pm$ 10,3
5	89 $\pm$ 1,4	41,6 $\pm$ 14,1	72 $\pm$ 1,4	60,1 $\pm$ 12,8	66,6 $\pm$ 13,2	29,3 $\pm$ 9,2
50	84,5 $\pm$ 3,5	36 $\pm$ 0	75,5 $\pm$ 0,7	57,8 $\pm$ 10,9	70,3 $\pm$ 5,03	25,8 $\pm$ 5,9
100	91,5 $\pm$ 2,1	49,2 $\pm$ 13,5	76,5 $\pm$ 3,5	57,5 $\pm$ 9,2	62,3 $\pm$ 17,6	32,5 $\pm$ 7,1
500	85,5 $\pm$ 16,2	42,8 $\pm$ 13,6	83 $\pm$ 12,7	55,6 $\pm$ 9,22	42 $\pm$ 7,2	39,2 $\pm$ 13,1

**TABLA III.** Efecto de 4 concentraciones de 5-fluorocitosina sobre 6 funciones de los leucocitos polimorfonucleares. Los resultados se expresan como la media aritmética de 10 experimentos  $\pm$  la desviación típica, (I.A.P.= Índice de Adherencia al Plástico; I.A.N.= Índice de Adherencia al Nylon; I.M.E.= Índice de Movilidad Espontánea; I.Q. = Índice de Quimiotaxis; I.F.= Índice de Fagocitosis; I.M.I. = Índice de Muerte Intracelular.

KTZ ( $\mu\text{g/ml}$ )	I.A.P.	I.A.N.	I.M.E.	I.Q.	I.F.	I.M.I.
<b>Control</b>	80,4 $\pm$ 8,56	54,8 $\pm$ 28,8	66,5 $\pm$ 38,8	60,8 $\pm$ 27,6	55,4 $\pm$ 2,96	30,3 $\pm$ 14,5
<b>0,1</b>	74,4 $\pm$ 12,8	65,3 $\pm$ 21,6	59,5 $\pm$ 40,3	65,5 $\pm$ 31,1	69,6 $\pm$ 3,64	29,8 $\pm$ 15,4
<b>1</b>	70,4 $\pm$ 18,4	51,3 $\pm$ 21,6	70 $\pm$ 0	58 $\pm$ 26,4	65,6 $\pm$ 14,8	29,3 $\pm$ 15,3
<b>5</b>	76,7 $\pm$ 12,4	29 $\pm$ 24,04	19 $\pm$ 0*	20 $\pm$ 3,1*	61,2 $\pm$ 9,4	39,3 $\pm$ 26,3
<b>50</b>	85,2 $\pm$ 7,04	74,3 $\pm$ 8,3	14 $\pm$ 0*	0*	53,2 $\pm$ 15	19,05 $\pm$ 15

**TABLA IV.** Efecto de 4 concentraciones de ketoconazol sobre 6 funciones de los leucocitos polimorfonucleares. Los resultados se expresan como la media aritmética de 10 experimentos  $\pm$  la desviación típica, (I.A.P.= Índice de Adherencia al Plástico; I.A.N.= Índice de Adherencia al Nylon; I.M.E.= Índice de Movilidad Espontánea; I.Q. = Índice de Quimiotaxis; I.F.= Índice de Fagocitosis; I.M.I. = Índice de Muerte Intracelular.) (\*) indica que los resultados obtenidos fueron significativamente distintos a las muestras control, tras aplicarles el test de ANOVA ( $p < 0,01$ ).

FLU ( $\mu\text{g/ml}$ )	I.A.P.	I.A.N.	I.M.E.	I.Q.	I.F.	I.M.I.
<b>Control</b>	81,6 $\pm$ 8,6	46,5 $\pm$ 16,5	68,5 $\pm$ 25,2	64,6 $\pm$ 6,5	62 $\pm$ 12,7	40,2 $\pm$ 1,7
<b>0,1</b>	86,3 $\pm$ 5,03	44,5 $\pm$ 14,3	75 $\pm$ 36,5	60,1 $\pm$ 12,8	61,5 $\pm$ 14,8	37,4 $\pm$ 4,09
<b>10</b>	87,8 $\pm$ 13	50,3 $\pm$ 18,9	60,2 $\pm$ 34,1	63,6 $\pm$ 28,4	57,5 $\pm$ 9,1	36 $\pm$ 34,8
<b>25</b>	90,4 $\pm$ 7,8	55,1 $\pm$ 18,9	62,5 $\pm$ 20,5	62,3 $\pm$ 9,2	63 $\pm$ 4,2	38 $\pm$ 3,4
<b>100</b>	89,2 $\pm$ 6,5	54,6 $\pm$ 18,2	52 $\pm$ 33,1	56,1 $\pm$ 12,6	72 $\pm$ 7,07	32 $\pm$ 3,3

**TABLA V.** Efecto de 4 concentraciones de fluconazol sobre 6 funciones de los leucocitos polimorfonucleares. Los resultados se expresan como la media aritmética de 10 experimentos  $\pm$  la desviación típica, (I.A.P.= Índice de Adherencia al Plástico; I.A.N.= Índice de Adherencia al Nylon; I.M.E.= Índice de Movilidad Espontánea; I.Q. = Índice de Quimiotaxis; I.F.= Índice de Fagocitosis; I.M.I. = Índice de Muerte Intracelular.)



UK ( $\mu\text{g/ml}$ )	I.A.P.	I.A.N.	I.M.E.	I.Q.	I.F.	I.M.I.
Control	88,5 $\pm$ 2,1	40,7 $\pm$ 15,3	77,3 $\pm$ 17,6	61,8 $\pm$ 8,2	60 $\pm$ 11,2	29,6 $\pm$ 10,5
0,1	90 $\pm$ 0,7	27,7 $\pm$ 24,9	74,3 $\pm$ 38,9	59,1 $\pm$ 3,6	75 $\pm$ 12,5	32,4 $\pm$ 9,8
1	89,5 $\pm$ 0,7	41,5 $\pm$ 14	65,7 $\pm$ 24,6	64,2 $\pm$ 3,84	65,3 $\pm$ 19,5	31,9 $\pm$ 10,6
5	90 $\pm$ 0	44 $\pm$ 25,5	61,3 $\pm$ 20,8	51,2 $\pm$ 13,9	53,3 $\pm$ 8,08	32,2 $\pm$ 8,8
100	88 $\pm$ 2,8	37 $\pm$ 27,6	40,8 $\pm$ 10,8	32,1 $\pm$ 3,6*	47,3 $\pm$ 4,6*	39,9 $\pm$ 15,6

**TABLA VI.** Efecto de 4 concentraciones de UK 109,496 sobre 6 funciones de los leucocitos polimorfonucleares. Los resultados se expresan como la media aritmética de 10 experimentos  $\pm$  la desviación típica, (I.A.P.= Índice de Adherencia al Plástico; I.A.N.= Índice de Adherencia al Nylon; I.M.E.= Índice de Movilidad Espontánea; I.Q. = Índice de Quimiotaxis; I.F.= Índice de Fagocitosis; I.M.I. = Índice de Muerte Intracelular.) (\*) indica que los resultados obtenidos fueron significativamente distintos a las muestras control, tras aplicarles el test de ANOVA ( $p<0,01$ ).

	AMB	5FC	KTZ	FLU	UK
I.A.P.	CI	CI	CI	CI	CI
I.A.N.	<b>CD</b>	CI	CI	CI	CI
I.M.E.	<b>CD</b>	CI	<b>CD</b>	CI	<b>CD</b>
I.Q.	<b>CD</b>	CI	<b>CD</b>	CI	<b>CD</b>
I.F.	<b>CD</b>	CI	CI	CI	CI
I.M.I.	<b>CD</b>	CI	CI	CI	CI

**TABLA VII.** Clasificación de la influencia ejercida por los antifúngicos sobre cada una de las funciones leucocitarias estudiadas, atendiendo al criterio de concentración dependencia establecido por el parámetro estadístico  $r$  ( $p < 0,01$ ). (**CD** = concentración dependiente; **CI** = concentración independiente).

	AMB	5FC	KTZ	FLU	UK
IC <sub>90</sub> (µg/ml)	0.125	64	1	16	0.125

**TABLA VIII.**- IC<sub>90</sub> de los cinco antifúngicos frente a *Cr. neoformans* (1-5 x 10<sup>3</sup> UFC/ml).

TASA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)						
AMB (µg/ml)	12	24	36	48	60	72
0 + S	51,02±2,3	90,8±1,2*	97,1±0,5*	99,8±0,04*	99,9±0,03*	99,9±0,01*
0,125	69,8±2,4*	78,6±2,2*	99,6±0,02*	99,9±0,01*	99,9±0,02*	99,9±0,03*
0,125 +S	0	16,8±4,4*	0*	27,5±3,9*	25,8±3,3*	25,8±3,5*
4	76,5±4,3*	98,05±0,5*	99,6±0,01*	99,9±0,02*	99,9±0,01*	99,9±0,01*
4 + S	22,3±4,1	58,3±3,2	64,5±3,5**	77,1±2,8**	82,2±2,1**	86,1±2,3**

**TABLA IX.** Tasa de inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* tratado con diferentes concentraciones de AMB y el 10 % de suero (+ S). Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos ± la desviación típica. (\*) indica que el crecimiento de la levadura fue significativamente distinto con respecto a su control ( $p < 0,01$ ). La diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de las levaduras tratadas con antifúngico y suero con respecto a las que no se trataron con suero se expresa como (\*).

TASA DE MUERTE (%)						
AMB (µg/ml)	12	24	36	48	60	72
0 + S	0	0	0	0	0	0
0,125	0	6,6±4,2	43,7±4,4	52,1±3,8	30,8±3,4	0
0,125 +S	0	0	0	0	0	0
4	10,8±5,3	18,7±4,7	59,2±3,6	61,09±3,2	72,7±3,4	80,9±2,8
4 + S	0	0	0	0	0	0

**TABLA X.** Tasa de muerte de *Cr. neoformans* tratado con diferentes concentraciones de AMB y el 10 % de suero (+ S). Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos ± la desviación típica.

TASA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)						
5FC ( $\mu\text{g/ml}$ )	12	24	36	48	60	72
0 + S	45,04 $\pm$ 5,3	90,4 $\pm$ 3,2*	97,6 $\pm$ 0,3*	99,9 $\pm$ 0,02*	99,9 $\pm$ 0,03*	99,9 $\pm$ 0,01*
64	83,4 $\pm$ 4,1*	96,9 $\pm$ 1,2*	99,2 $\pm$ 0,01*	99,9 $\pm$ 0,01*	99,9 $\pm$ 0,02*	99,9 $\pm$ 0,01*
64 +S	64,5 $\pm$ 3,9*	69,09 $\pm$ 3,2*	80,04 $\pm$ 2,3*	78,1 $\pm$ 3,1*	77,6 $\pm$ 3,3*	76,5 $\pm$ 4,1*
100	82,6 $\pm$ 2,8*	98,6 $\pm$ 0,2*	99,6 $\pm$ 0,01*	99,9 $\pm$ 0,03*	99,9 $\pm$ 0,01*	99,9 $\pm$ 0,01*
100 + S	61,09 $\pm$ 3,7	82,6 $\pm$ 2,9	87,1 $\pm$ 2,5	88,7 $\pm$ 2,6	92,4 $\pm$ 1,3	94,5 $\pm$ 1,6

**TABLA XI.** Tasa de inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* tratado con diferentes concentraciones de 5FC y el 10 % de suero (+ S). Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos  $\pm$  la desviación típica. (\*) indica que el crecimiento de la levadura fue significativamente distinto con respecto a su control ( $p < 0,01$ ). La diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de las levaduras tratadas con antifúngico y suero con respecto a las que no se trataron con suero se expresa como (\*).

TASA DE MUERTE (%)						
5FC ( $\mu\text{g/ml}$ )	12	24	36	48	60	72
0 + S	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0
64 +S	0	0	0	0	0	0
100	0	42,4 $\pm$ 3,1	36,9 $\pm$ 3,5	48,7 $\pm$ 2,5	27,5 $\pm$ 3,7	6,6 $\pm$ 2,1
100 + S	0	27,5 $\pm$ 4,2	39,7 $\pm$ 2,6	29,2 $\pm$ 3,1	36,9 $\pm$ 2,4	45,04 $\pm$ 3,4

**TABLA XII.** Tasa de muerte de *Cr. neoformans* tratado conM diferentes concentraciones de 5FC y el 10 % de suero (+ S). Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos  $\pm$  la desviación típica.

TASA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)						
KTZ (µg/ml)	12	24	36	48	60	72
0 + S	54,2±4,3	76,01±3,4*	94,5±1,3*	99,9±0,04*	99,9±0,03*	99,9±0,03*
1	67,6±3,5*	96,3±1,1*	99,8±0,03*	99,9±0,01*	99,9±0,02*	99,9±0,02*
1 + S	46,2±3,5	47,5±3,1*	59,2±2,7*	66,1±3,3*	76,5±2,7*	85,8±2,1*
4	69±3,8*	98,2±0,05*	99,9±0,01*	99,9±0,01*	99,9±0,02*	100*
4 + S	46,2±4,1	49,8±3,5*	59,2±3,5*	70,4±2,9*	86,1±2,3*	93,9±1,6*

**TABLA XIII.** Tasa de inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* tratado con diferentes concentraciones de KTZ y el 10 % de suero (+ S). Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos ± la desviación típica. (\*) indica que el crecimiento de la levadura fue significativamente distinto con respecto a su control ( $p < 0,01$ ). La diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de las levaduras tratadas con antifúngico y suero con respecto a las que no se trataron con suero se expresa como (\*).

TASA DE MUERTE (%)						
KTZ (µg/ml)	12	24	36	48	60	72
0 + S	0	0	0	0	0	0
1	0	25,8±3,9	83,7±1,5	96±0,04	97,4±0,06	98,5±0,04
1 + S	0	0	0	0	0	16,8±2,3
4	0	64,5±2,3	91,8±0,9	97,7±0,06	98,6±0,08	99,2±0,03
4 + S	0	0	0	0	22,3±2,2	64,5±2,7

**TABLA XIV.** Tasa de muerte de *Cr. neoformans* tratado con diferentes concentraciones de KTZ y el 10 % de suero (+ S). Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos ± la desviación típica.

TASA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)						
FLU ( $\mu\text{g/ml}$ )	12	24	36	48	60	72
0 + S	30,8 $\pm$ 4,2	85,8 $\pm$ 2,8*	97,3 $\pm$ 0,06*	99,4 $\pm$ 0,02*	99,9 $\pm$ 0,02*	99,9 $\pm$ 0,01*
16	27,5 $\pm$ 3,9	99,9 $\pm$ 0,04*	99,8 $\pm$ 0,04*	99,9 $\pm$ 0,02*	99,9 $\pm$ 0,02*	99,9 $\pm$ 0,02*
16+S	10,8 $\pm$ 2,7	52,1 $\pm$ 3,5	73,1 $\pm$ 2,6**	85,2 $\pm$ 3,1**	93,6 $\pm$ 1,3**	97,4 $\pm$ 2,1**
32	43,7 $\pm$ 3,6	97,1 $\pm$ 1,2*	99,9 $\pm$ 0,02*	99,9 $\pm$ 0,03*	99,9 $\pm$ 0,02*	100*
32 + S	0	57,3 $\pm$ 3,4	88,5 $\pm$ 2,3**	87,9 $\pm$ 1,9**	95,6 $\pm$ 1,2**	98,3 $\pm$ 0,3**

**TABLA XV.** Tasa de inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* tratado con diferentes concentraciones de FLU y el 10 % de suero (+ S). Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos  $\pm$  la desviación típica. (\*) indica que el crecimiento de la levadura fue significativamente distinto con respecto a su control ( $p < 0,01$ ). La diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de las levaduras tratadas con antifúngico y suero con respecto a las que no se trataron con suero se expresa como (\*).

TASA DE MUERTE (%)						
FLU ( $\mu\text{g/ml}$ )	12	24	36	48	60	72
0 + S	0	0	0	0	0	0
16	0	0	51,02 $\pm$ 3,1	57,3 $\pm$ 2,6	86,5 $\pm$ 2,3	95,8 $\pm$ 1,7
16 + S	0	0	0	0	25,8 $\pm$ 3,4	63,6 $\pm$ 2,7
32	0	0	77,6 $\pm$ 2,8	84,8 $\pm$ 1,6	92,4 $\pm$ 0,8	96,2 $\pm$ 0,06
32 + S	0	0	6,6 $\pm$ 1,5	0	48,7 $\pm$ 3,2	76,01 $\pm$ 2,5

**TABLA XVI.** Tasa de muerte de *Cr. neoformans* tratado con diferentes concentraciones de FLU y el 10 % de suero (+ S). Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos  $\pm$  la desviación típica.

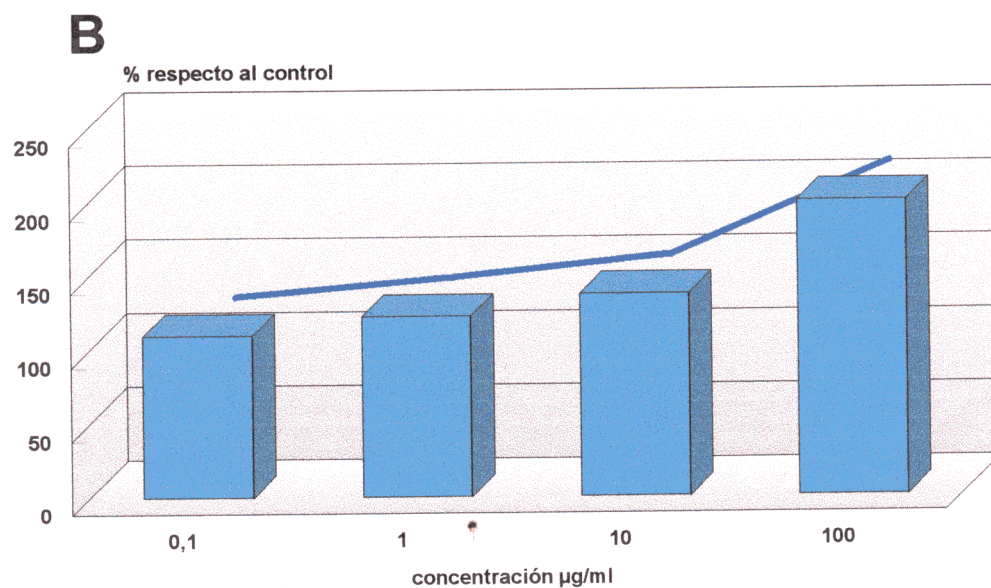
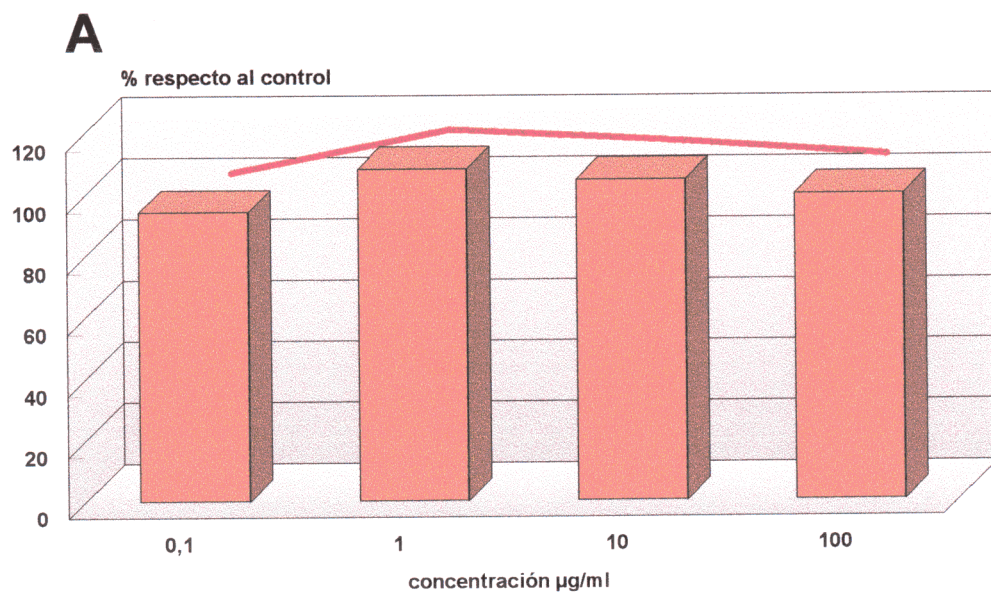
TASA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)						
UK ( $\mu\text{g/ml}$ )	12	24	36	48	60	72
0 + S	25,8 $\pm$ 5,1	81,8 $\pm$ 2,4*	94,6 $\pm$ 0,5*	99,6 $\pm$ 0,02*	99,8 $\pm$ 0,02*	99,9 $\pm$ 0,02*
0,125	42,4 $\pm$ 4,2	88,2 $\pm$ 2,3*	96,2 $\pm$ 1,1*	99,8 $\pm$ 0,03*	99,9 $\pm$ 0,01*	100*
0,125 + S	25,8 $\pm$ 2,4	33,9 $\pm$ 1,6	22,3 $\pm$ 3,2	24,1 $\pm$ 2,6	42,4 $\pm$ 4,2	61,1 $\pm$ 3,2*
4	68,3 $\pm$ 3,1*	99,9 $\pm$ 0,02*	99,7 $\pm$ 0,03*	99,9 $\pm$ 0,03*	99,9 $\pm$ 0,02*	100*
4 + S	29,2 $\pm$ 2,5	53,2 $\pm$ 3,3*	62,8 $\pm$ 2,6*	80 $\pm$ 1,9**	93,6 $\pm$ 1,8**	97,7 $\pm$ 0,7**

**TABLA XVII.** Tasa de inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* tratado con diferentes concentraciones de UK y el 10 % de suero (+ S). Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos  $\pm$  la desviación típica. (\*) indica que el crecimiento de la levadura fue significativamente distinto con respecto a su control ( $p < 0,01$ ). La diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de las levaduras tratadas con antifúngico y suero con respecto a las que no se trataron con suero se expresa como (\*).

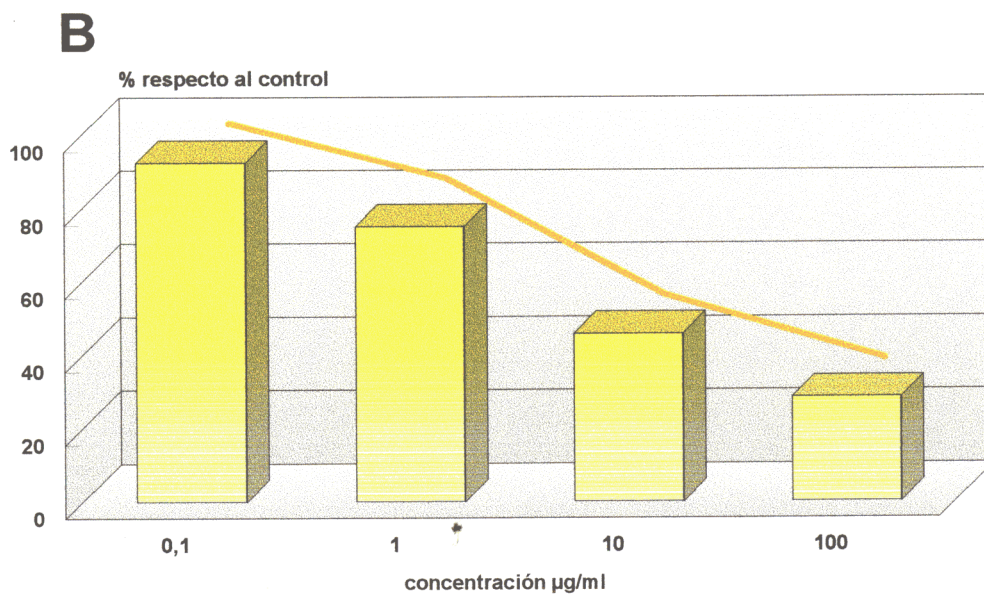
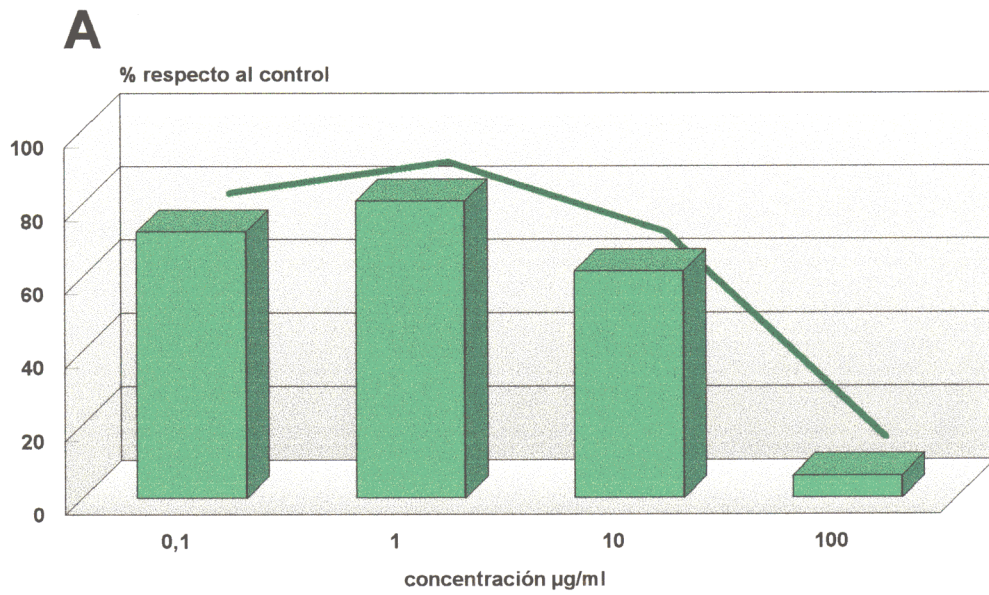
TASA DE MUERTE (%)						
UK ( $\mu\text{g/ml}$ )	12	24	36	48	60	72
0 + S	0	0	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0	0	39,7 $\pm$ 2,3
0,125 + S	0	0	0	0	0	0
4	0	12,9 $\pm$ 3,4	62,8 $\pm$ 3,2	82,6 $\pm$ 1,5	97,8 $\pm$ 0,06	99,6 $\pm$ 0,02
4 + S	0	0	0	0	14,8 $\pm$ 3,7	52,1 $\pm$ 4,1

**TABLA XVIII.** Tasa de muerte de *Cr. neoformans* tratado con diferentes concentraciones de UK y el 10 % de suero (+ S). Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos  $\pm$  la desviación típica.



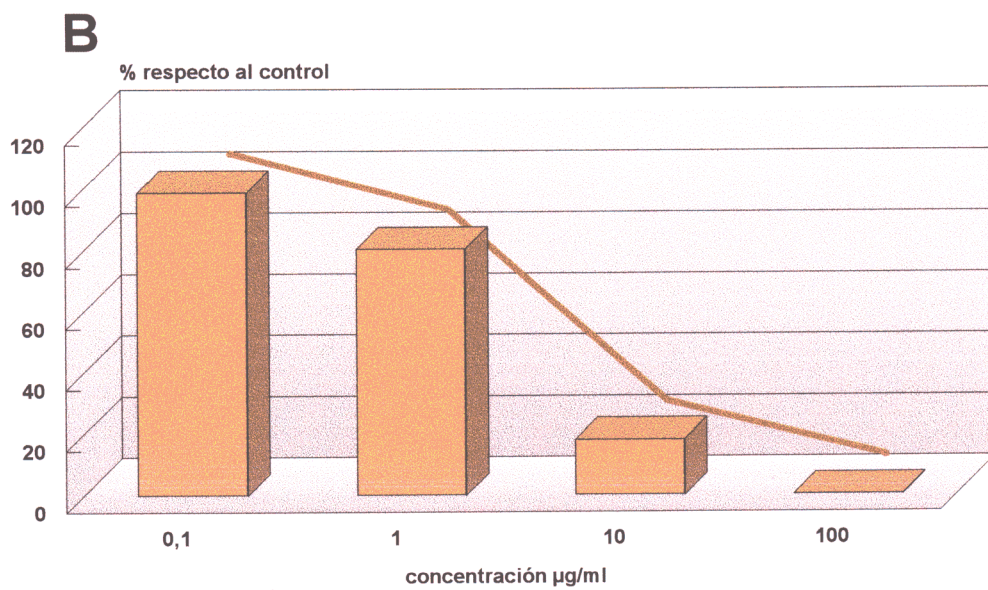
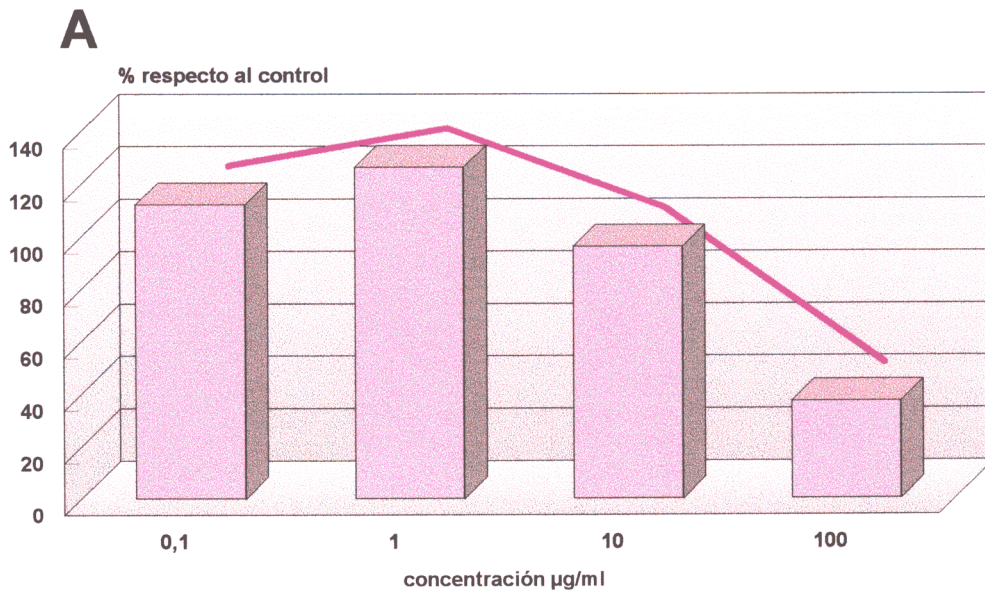


**FIGURA 17.-** Efecto de 4 concentraciones de AMB sobre la adherencia a plástico **(A)** y a nylon **(B)** de los leucocitos PMN.

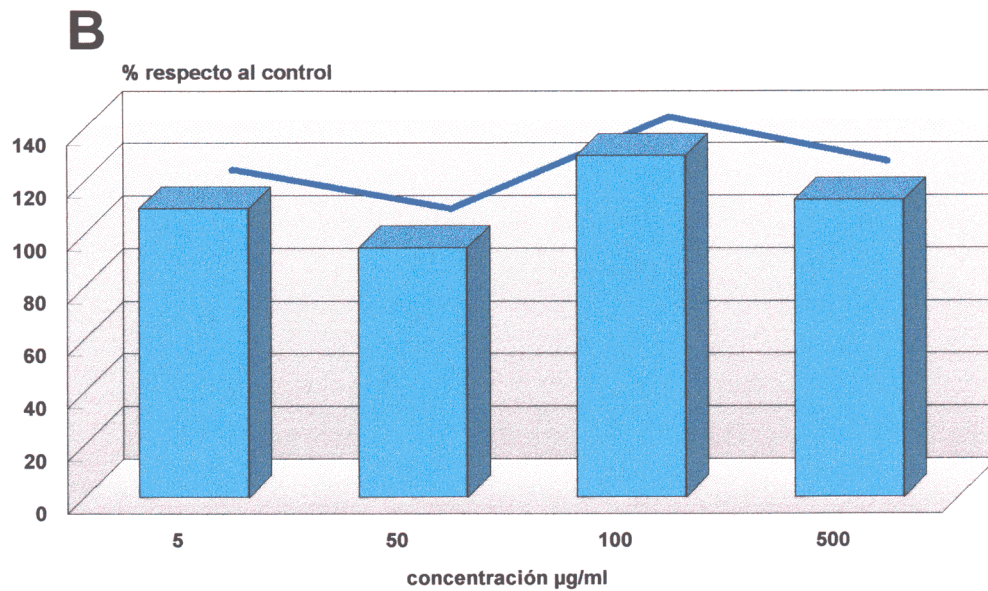
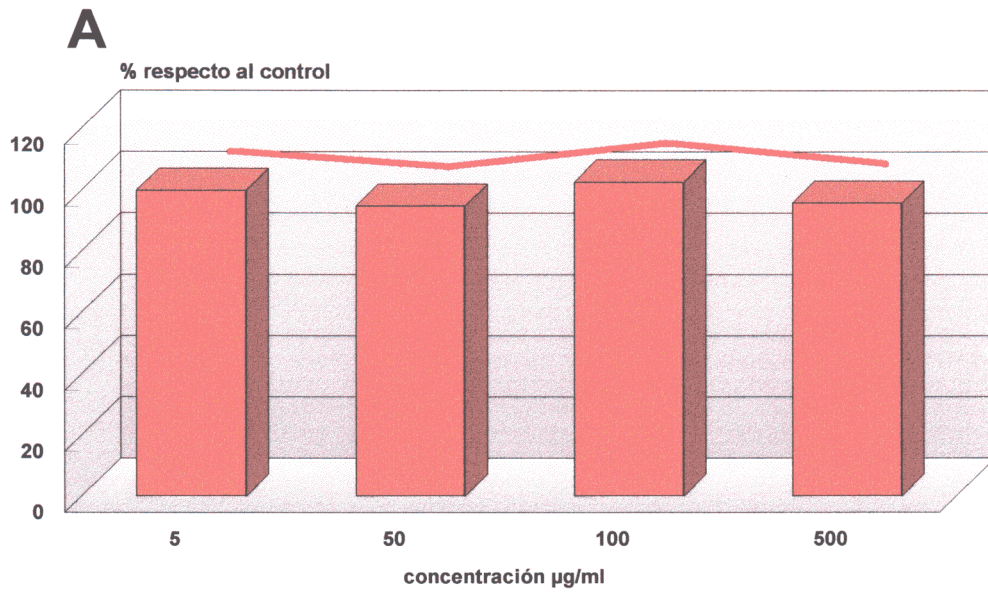


**FIGURA 18.-** Efecto de 4 concentraciones de AMB sobre la movilidad espontánea (A) y la quimiotaxis de los leucocitos PMN. (B).



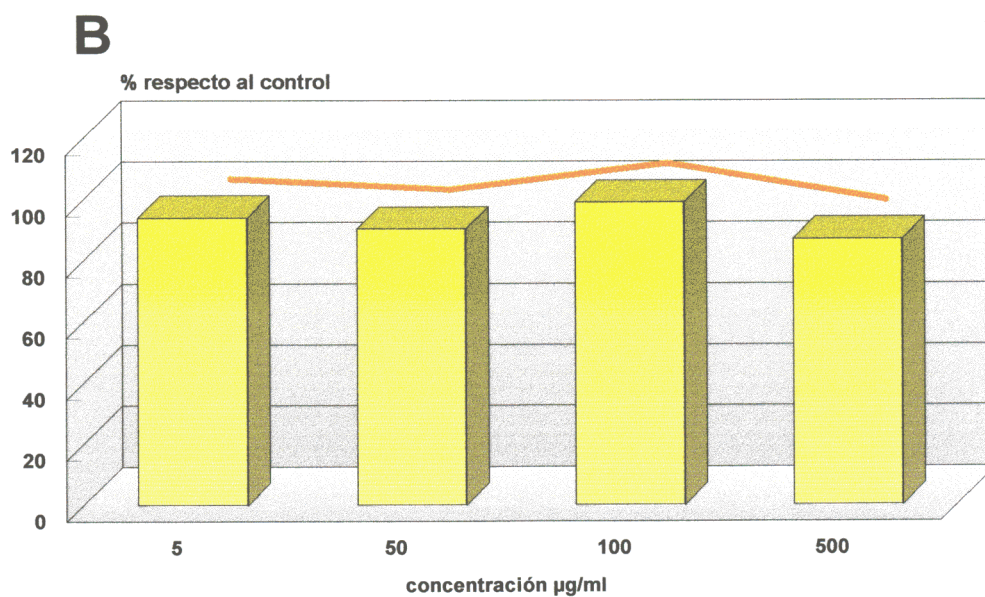
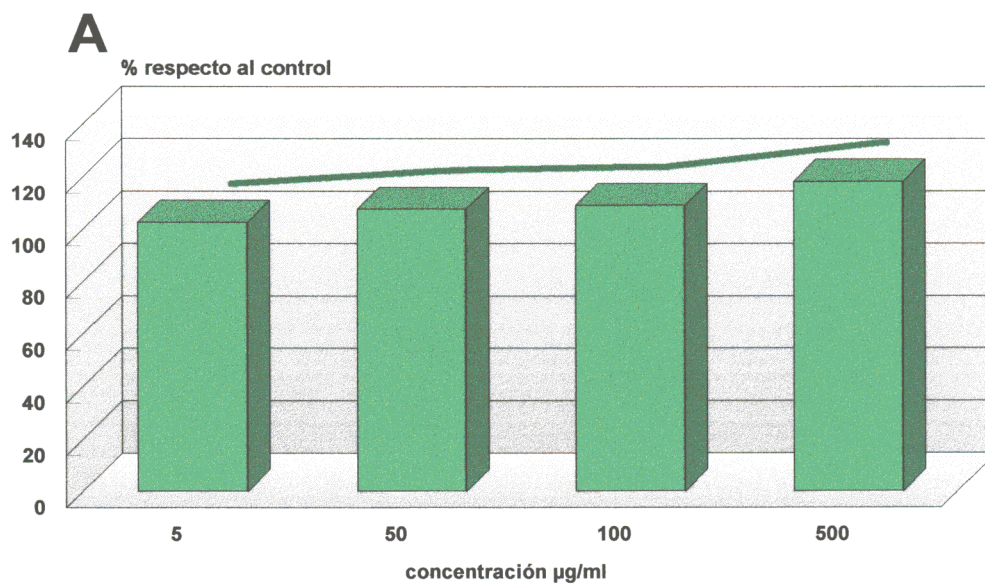


**FIGURA 19.-** Efecto de 4 concentraciones de AMB sobre la fagocitosis **(A)** y la muerte intracelular **(B)** de los leucocitos PMN.

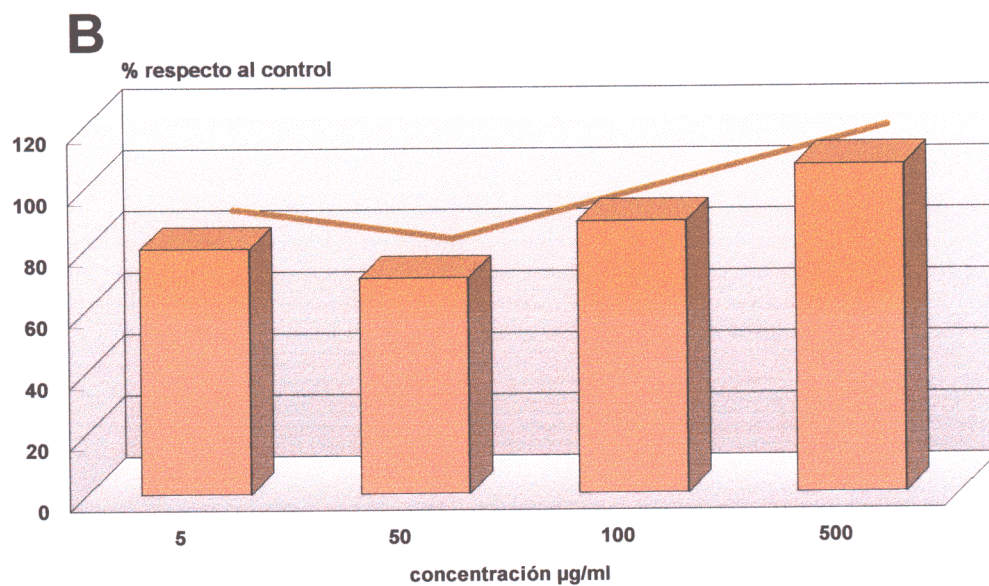
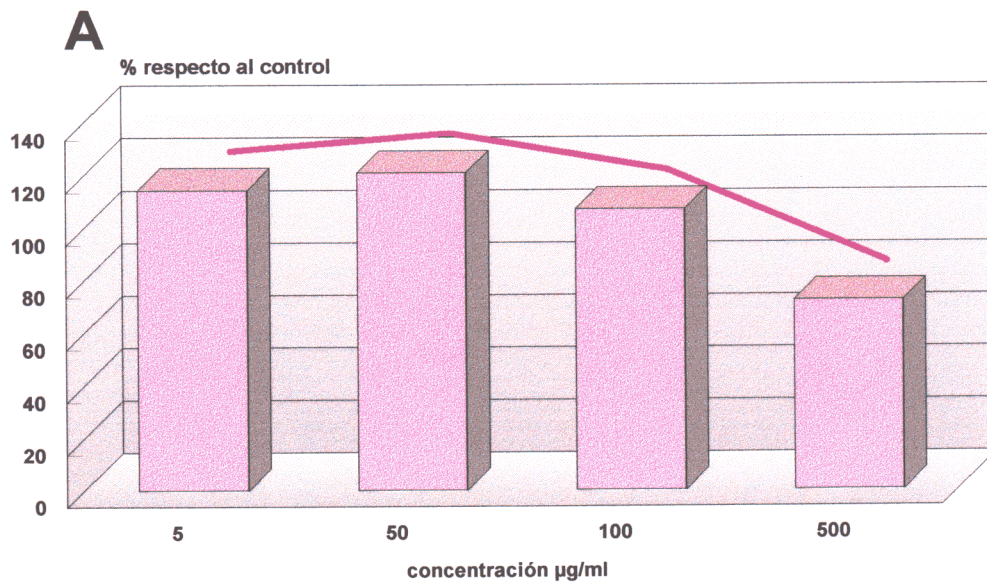


**FIGURA 20.-** Efecto de 4 concentraciones de 5FC sobre la adherencia a plástico (A) y a nylon (B) de los leucocitos PMN.



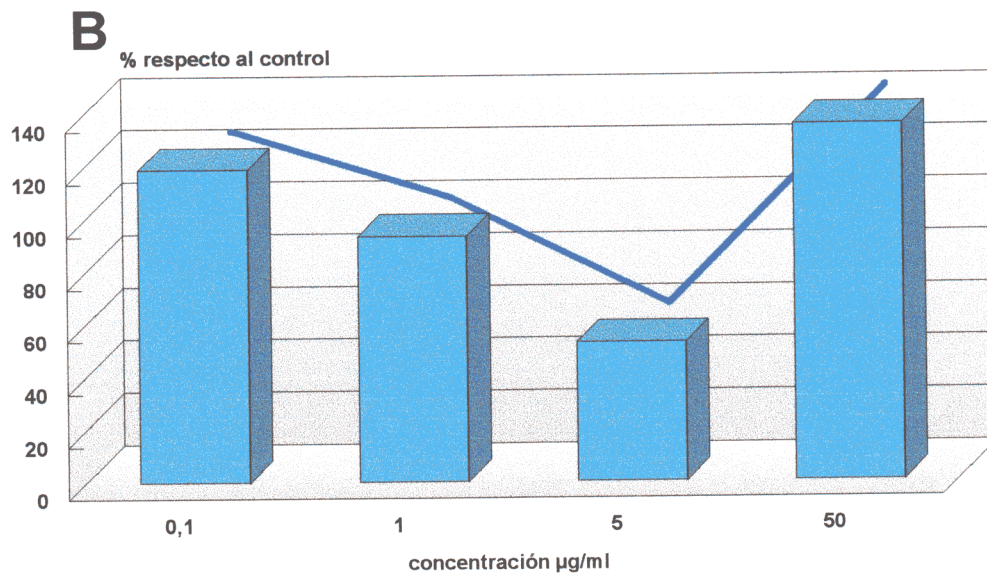
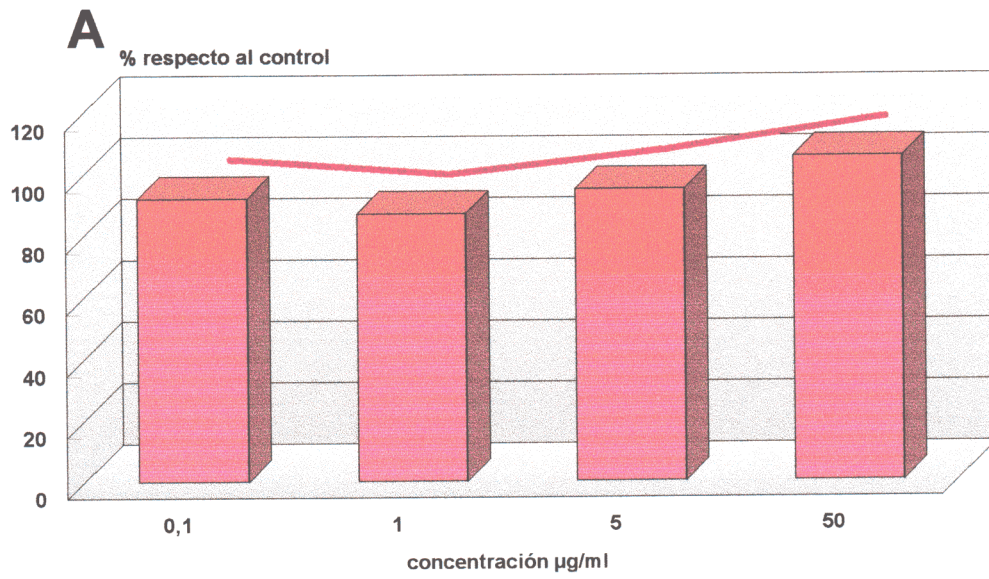


**FIGURA 21.-** Efecto de 4 concentraciones de 5FC sobre la movilidad espontánea (A) y la quimiotaxis de los leucocitos PMN. (B).

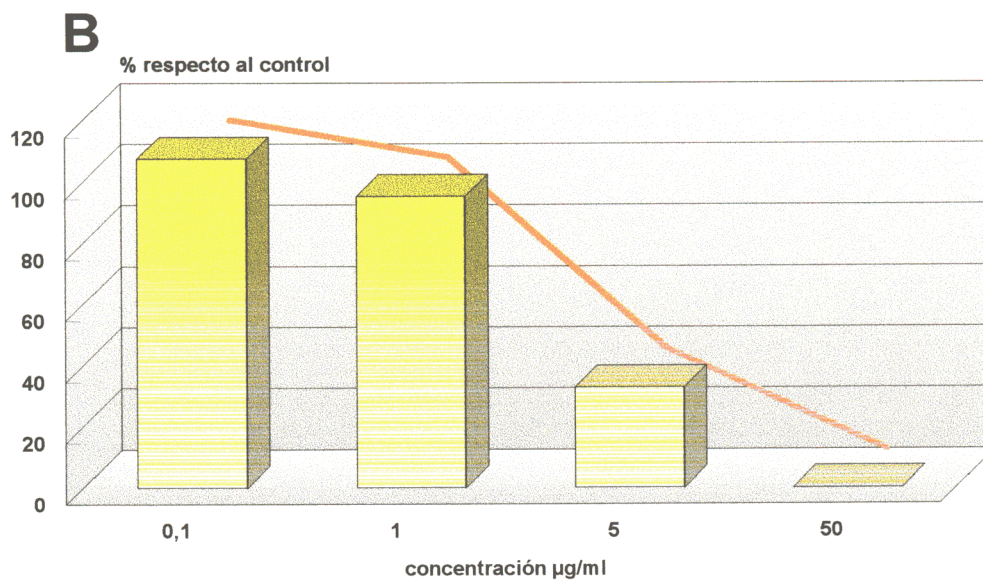
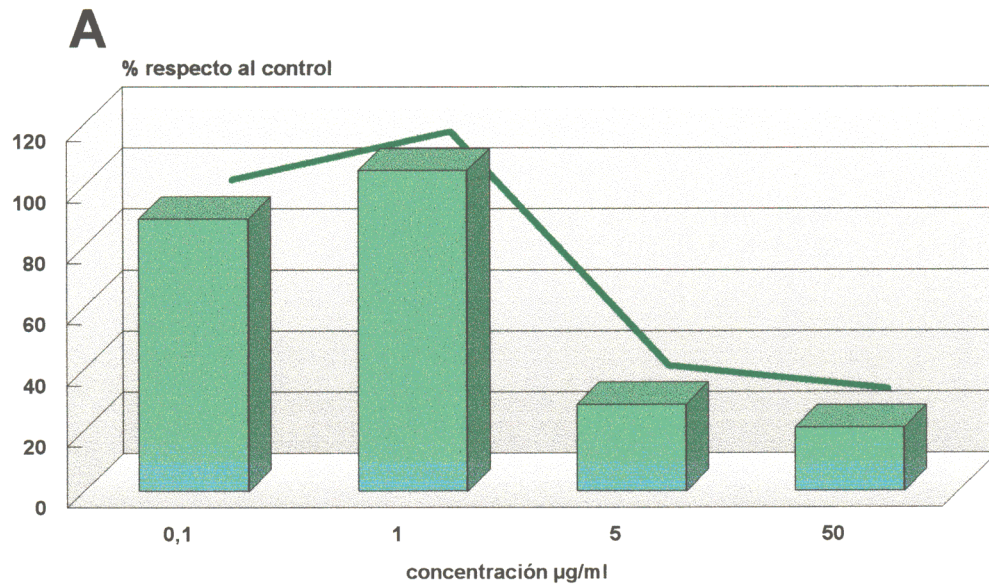


**FIGURA 22.-** Efecto de 4 concentraciones de 5FC sobre la movilidad espontánea **(A)** y la quimiotaxis de los leucocitos PMN. **(B)**.



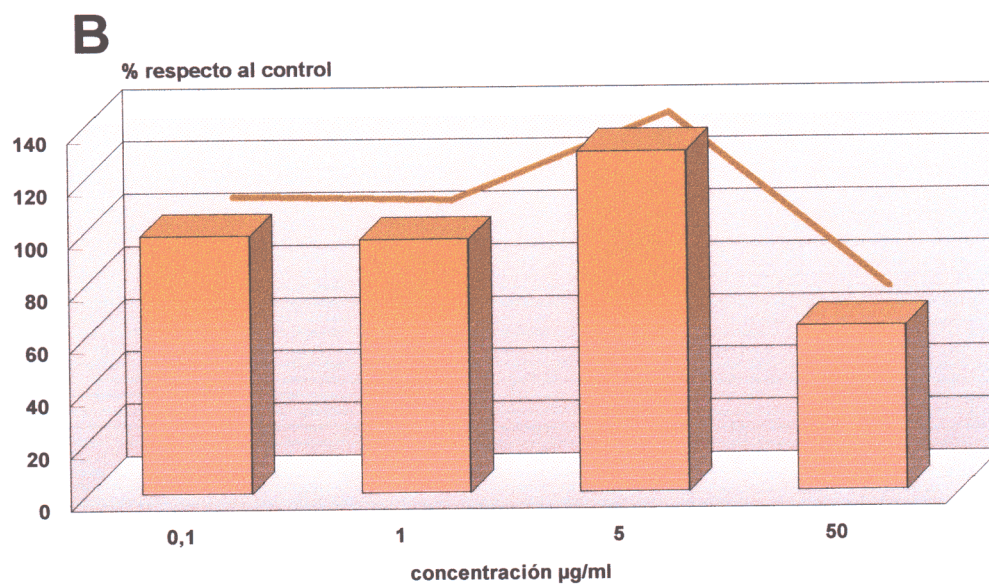
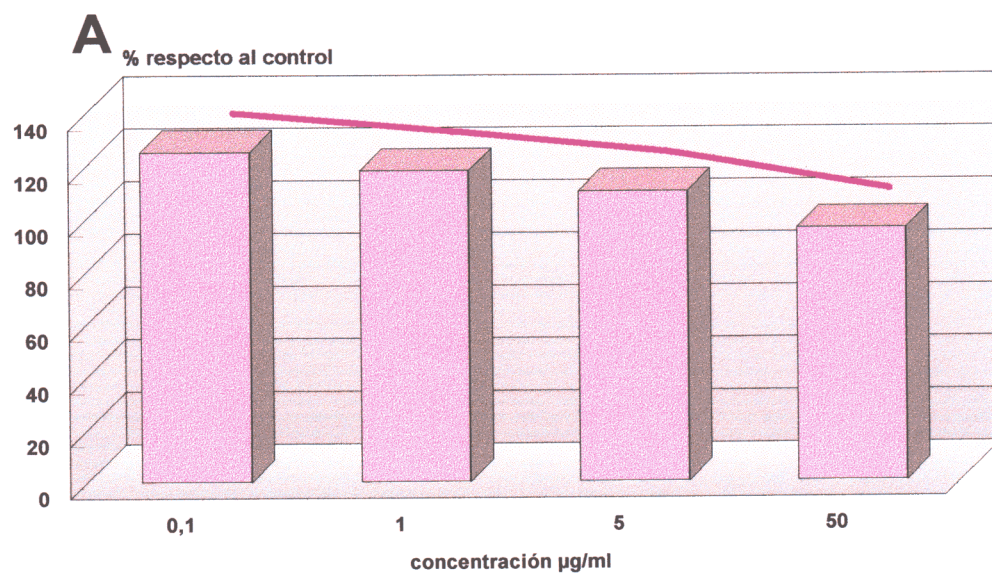


**FIGURA 23.-** Efecto de 4 concentraciones de KTZ sobre la adherencia al plástico **(A)** y a fibra de nylon **(B)** de los leucocitos PMN.

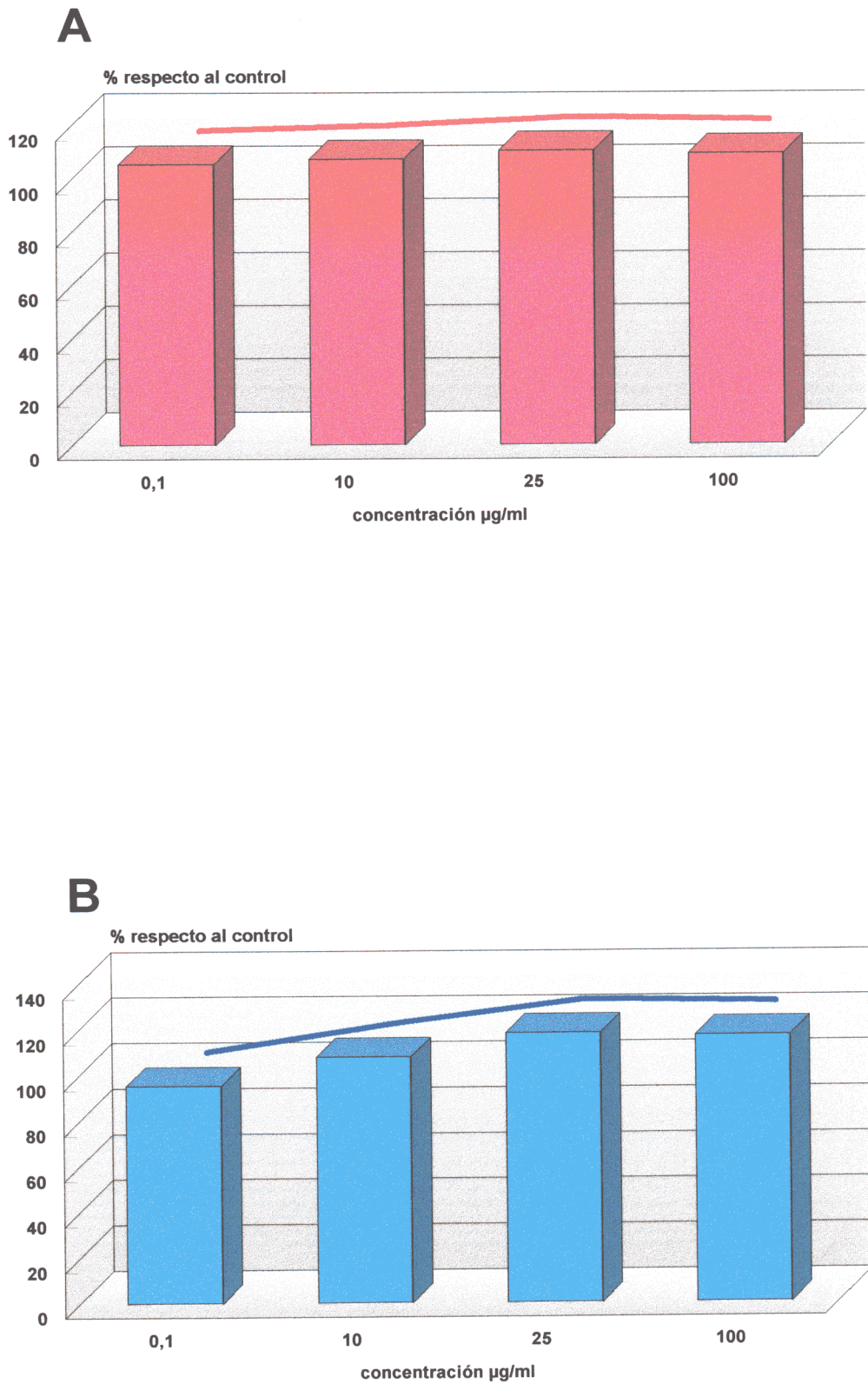


**FIGURA 24.-** Efecto de 4 concentraciones de KTZ sobre la movilidad espontánea **(A)** y la quimiotaxis **(B)** de los leucocitos PMN.



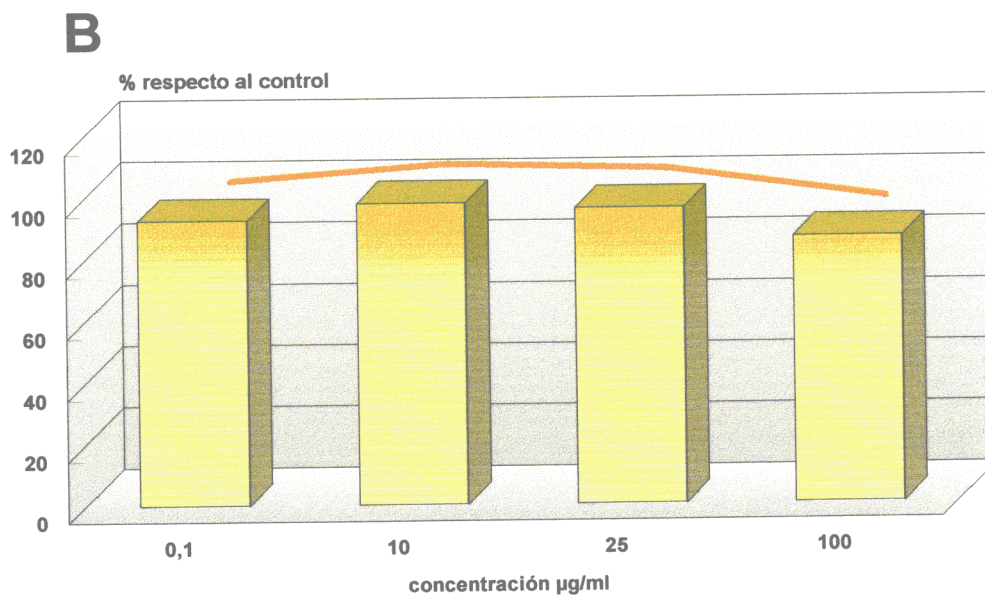
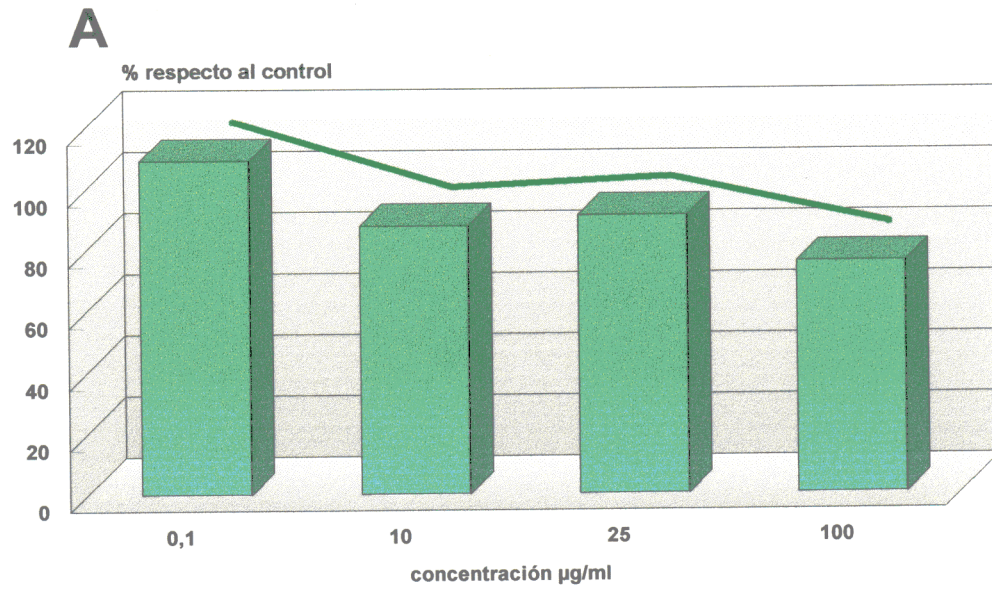


**FIGURA 25.-** Efecto de 4 concentraciones de KTZ sobre la fagocitosis **(A)** y la muerte intracelular **(B)** de los leucocitos PMN.

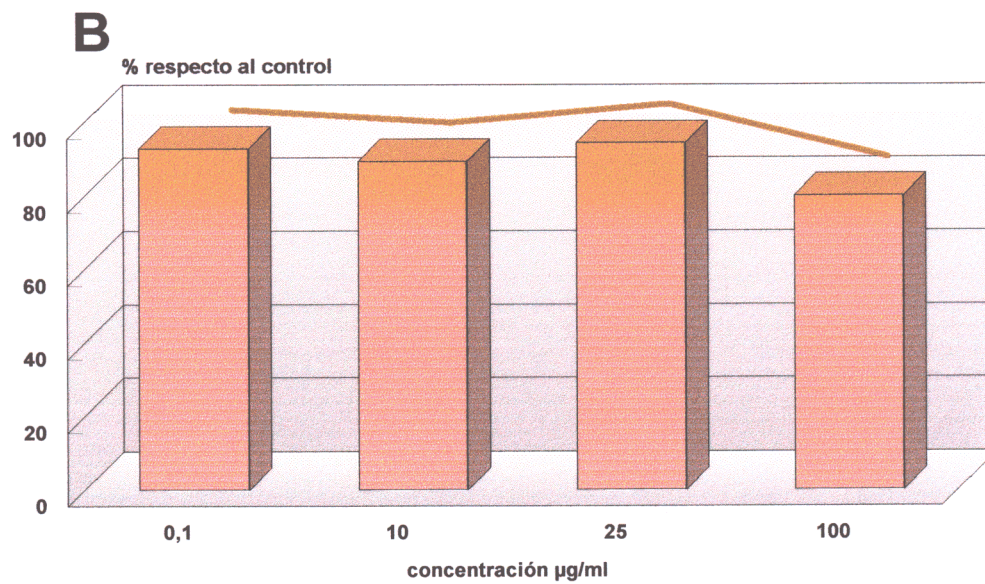
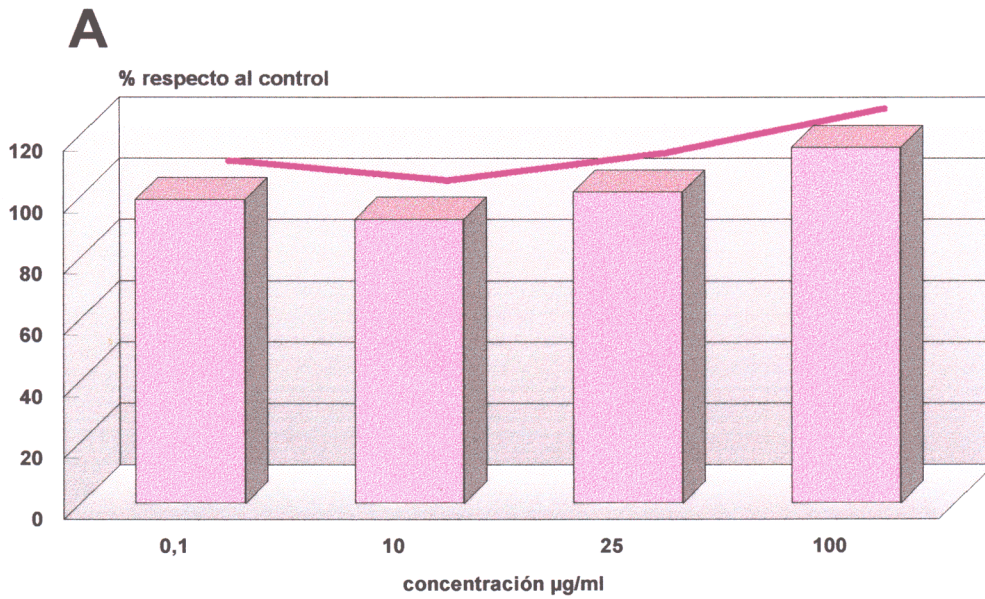


**FIGURA 26.-** Efecto de 4 concentraciones de FLU sobre la adherencia a plástico **(A)** y a fibra de nylon **(B)** de los leucocitos PMN.



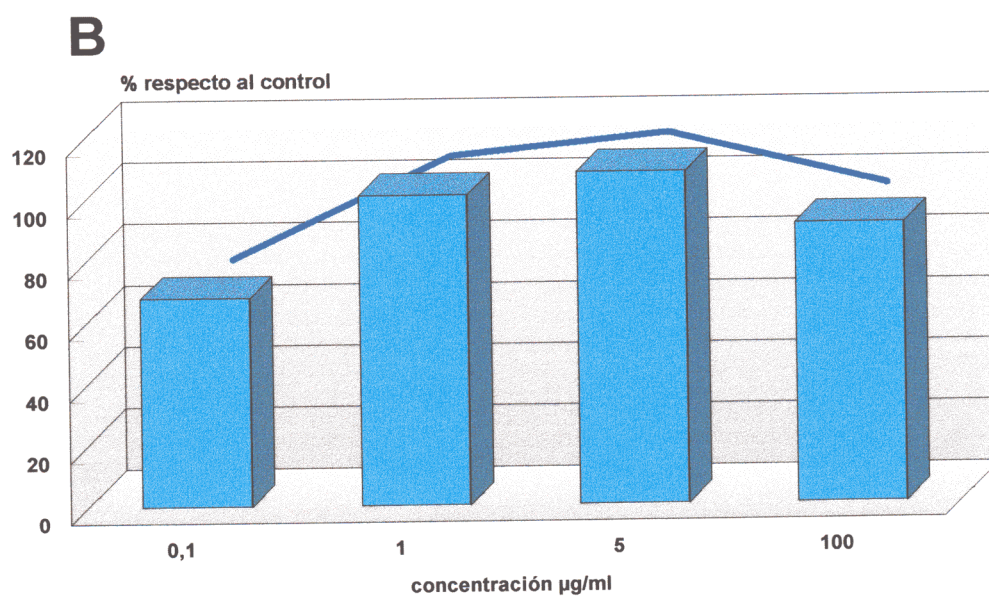
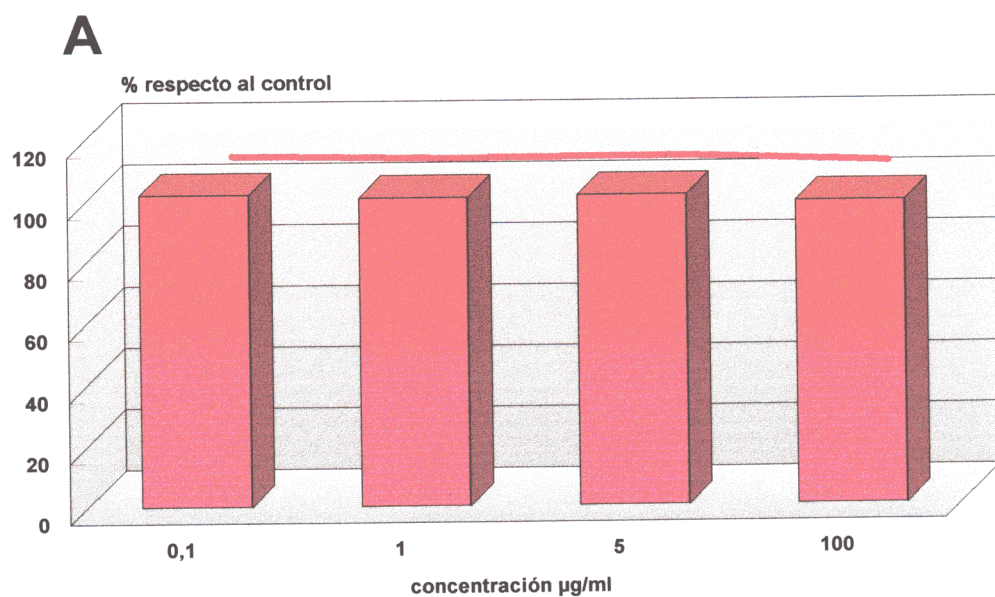


**FIGURA 27.-** Efecto de 4 concentraciones de FLU sobre la movilidad espontánea **(A)** y la quimiotaxis **(B)** de los leucocitos PMN.

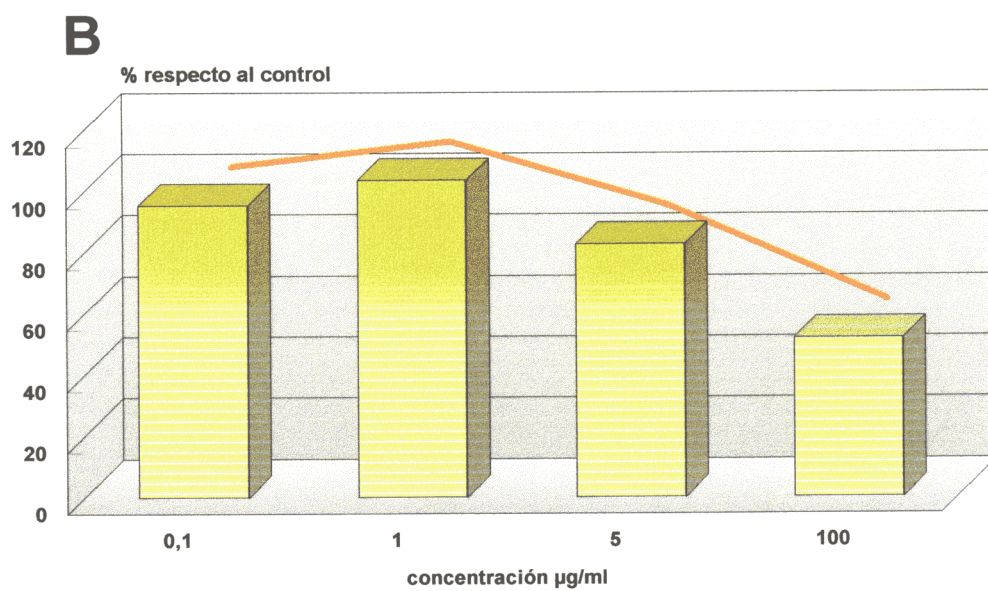
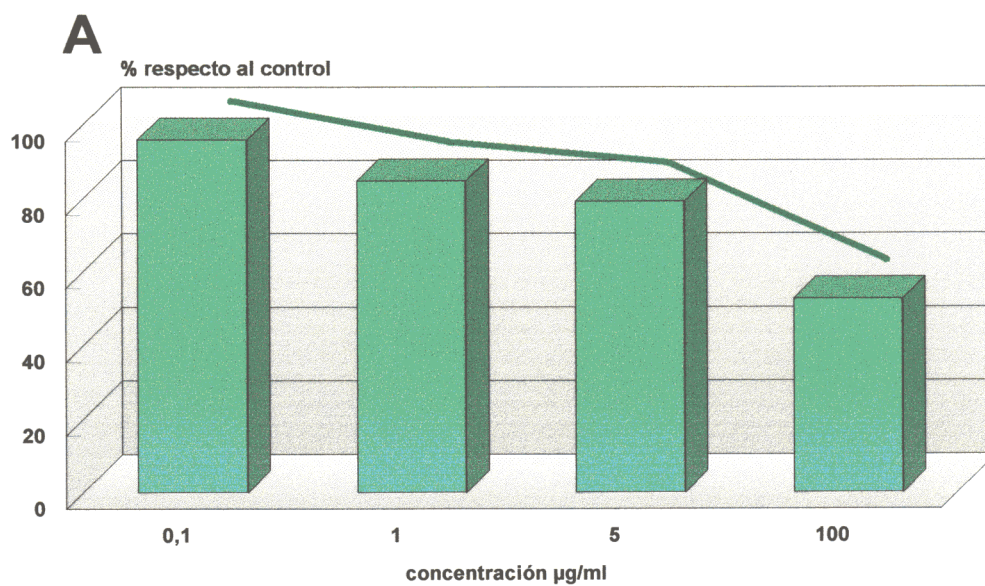


**FIGURA 28.-** Efecto de 4 concentraciones de FLU sobre la fagocitosis **(A)** y la muerte intracelular **(B)** de los leucocitos PMN.



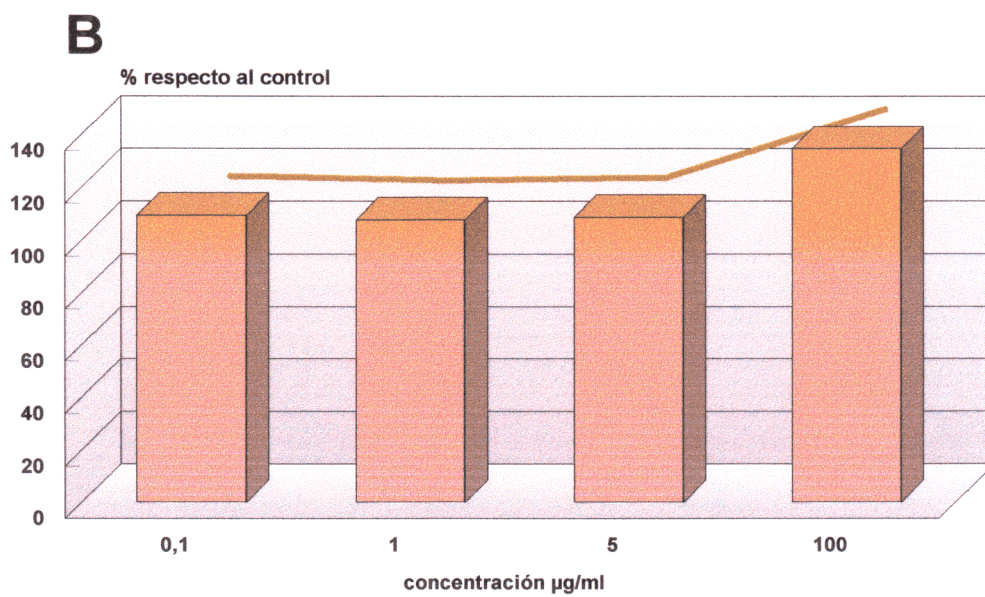
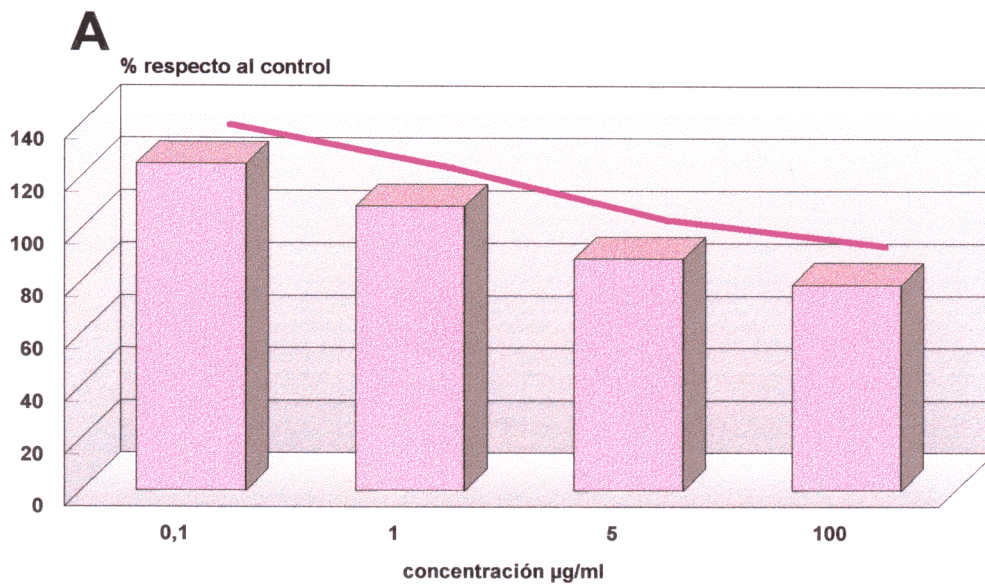


**FIGURA 29.-** Efecto de 4 concentraciones de UK sobre la adherencia a plástico (A) y a fibra de nylon (B) de los leucocitos PMN.

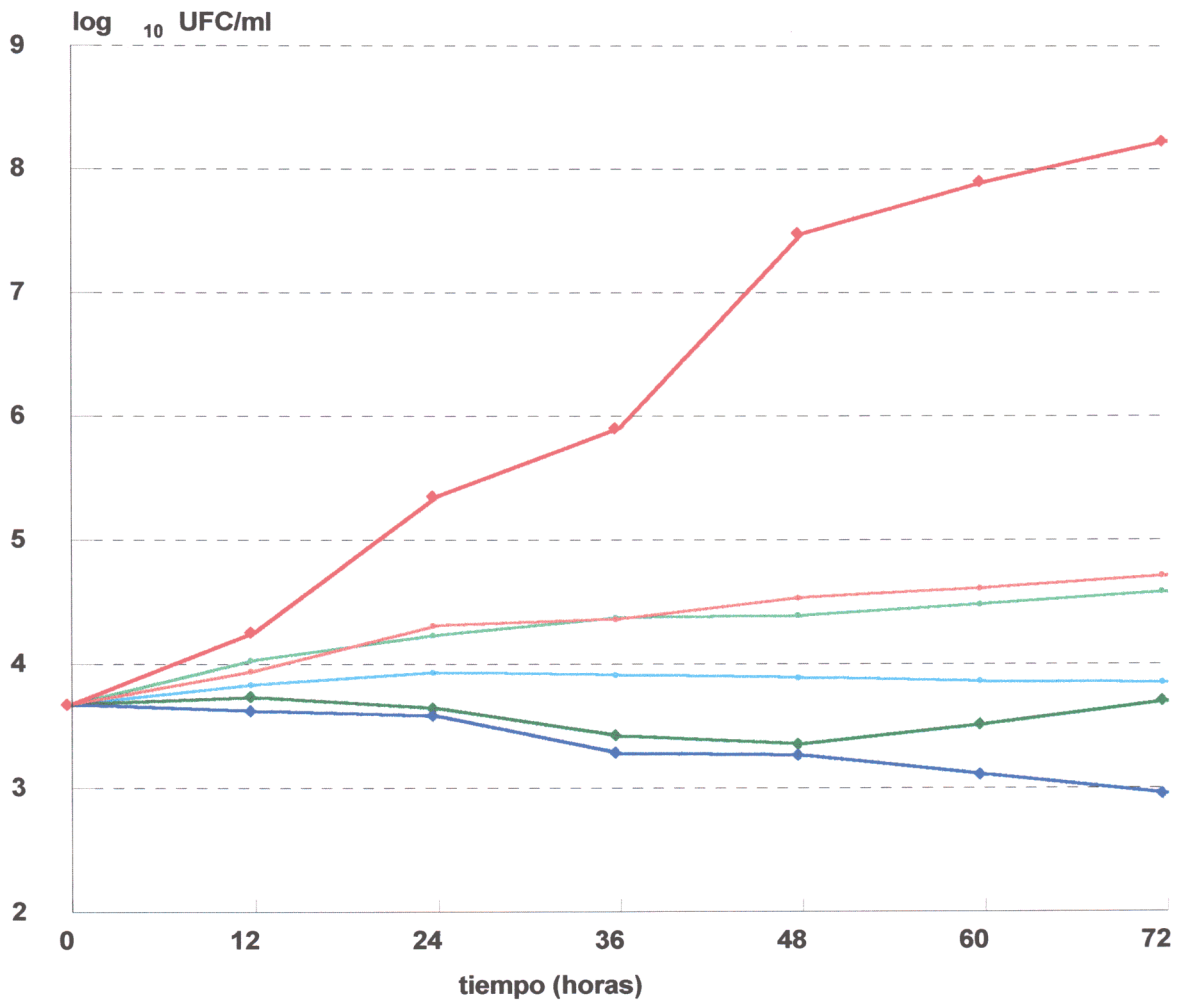


**FIGURA 30.-** Efecto de 4 concentraciones de UK sobre la movilidad espontánea **(A)** y la quimiotaxis **(B)** de los leucocitos PMN.



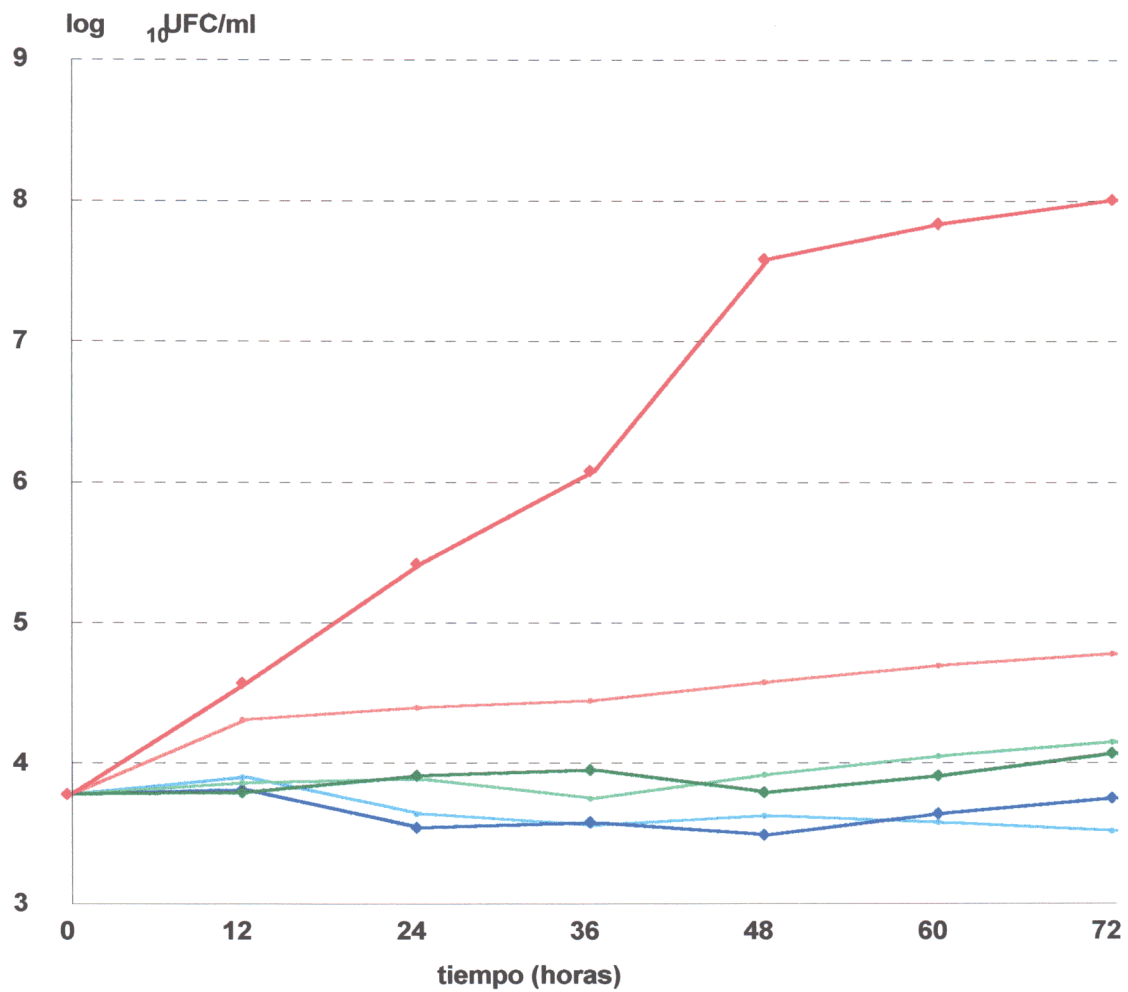


**FIGURA 31.-** Efecto de 4 concentraciones de UK sobre la fagocitosis **(A)** y la muerte intracelular **(B)** de los leucocitos PMN.

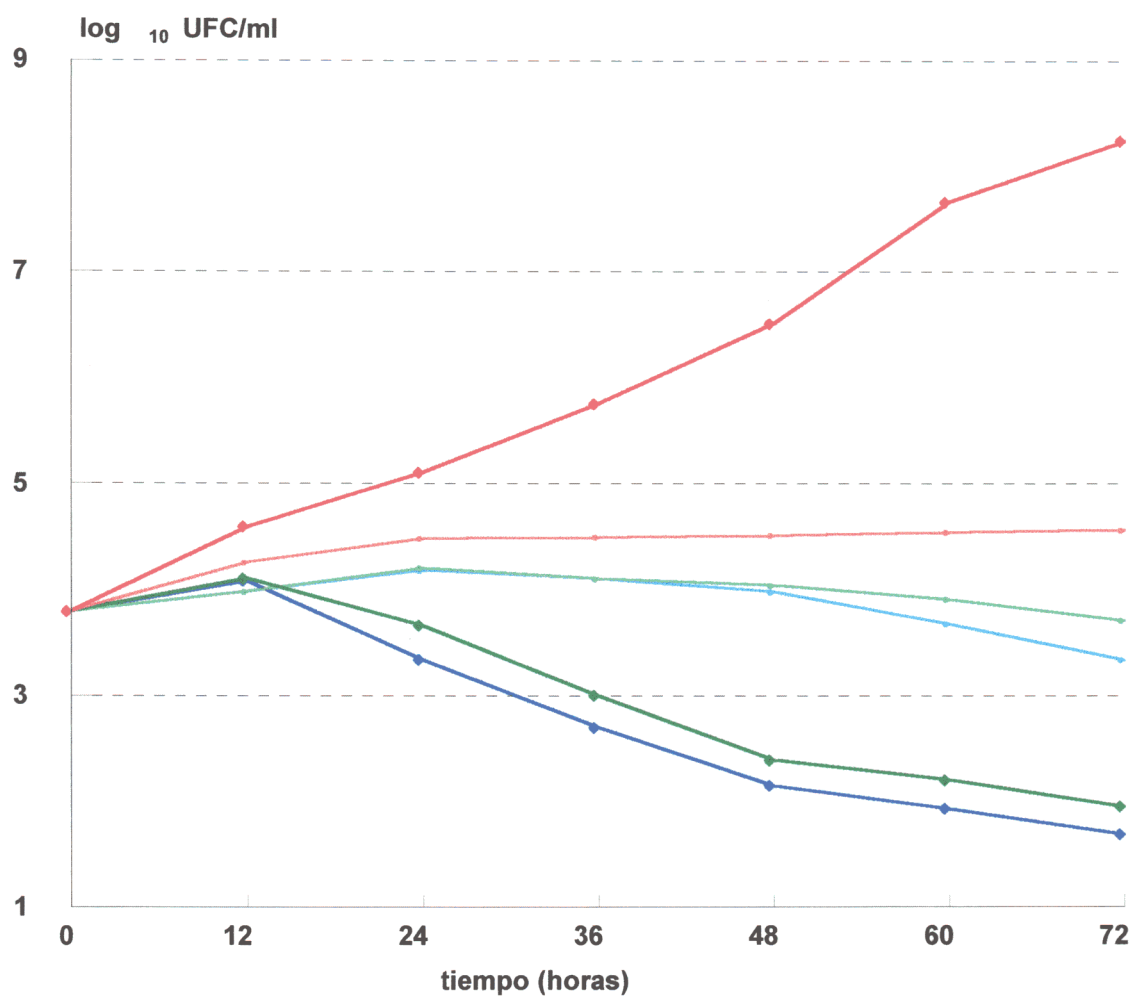


**FIGURA 32.-** Curva de letalidad de *Cryptococcus neoformans* tratado con 0,25 y 4  $\mu\text{g/ml}$  de AMB y expuesto al 10% de suero humano. (♦=control; ● = control con suero; ◆ = 0,25; ● = 0,25 con suero; ◆ = 4; ● = 4 con suero).

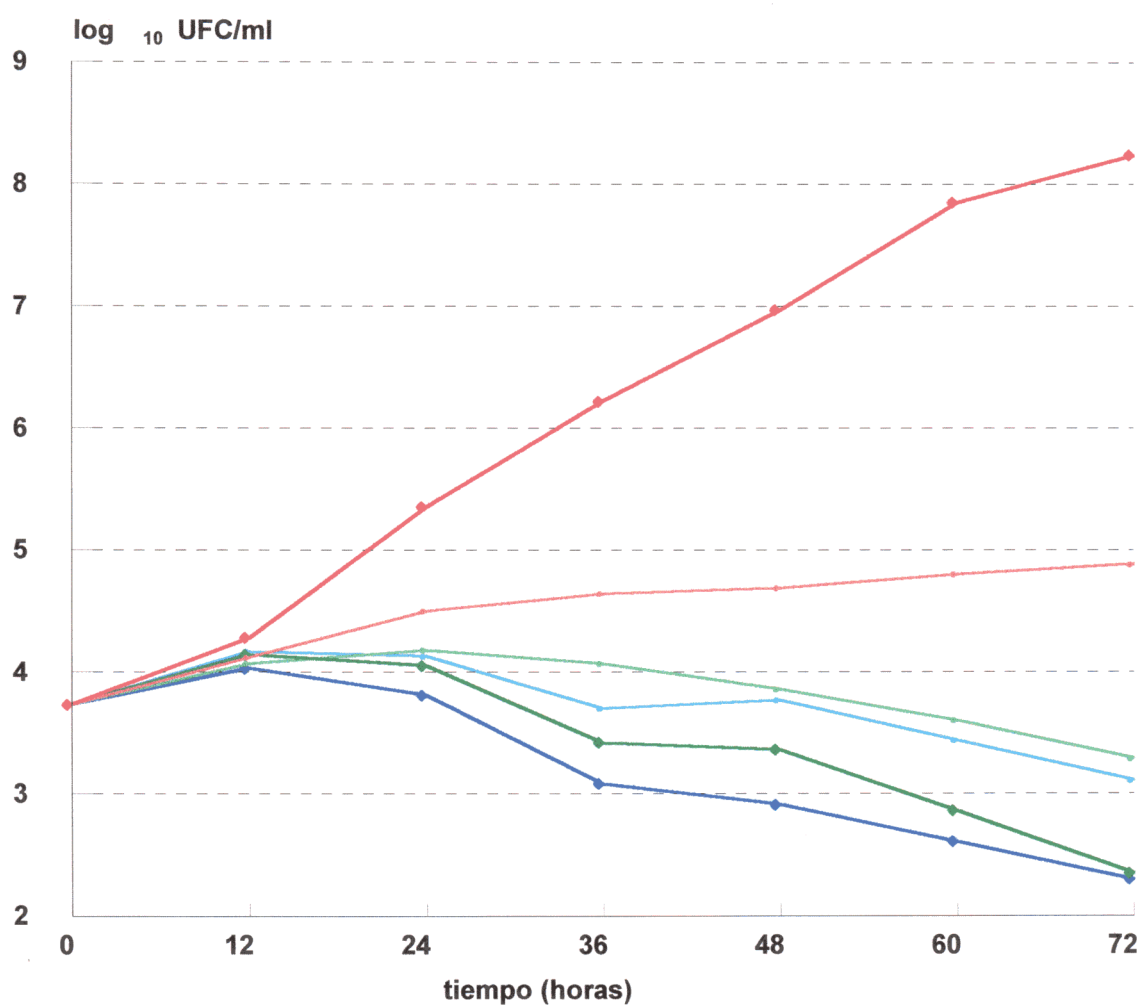




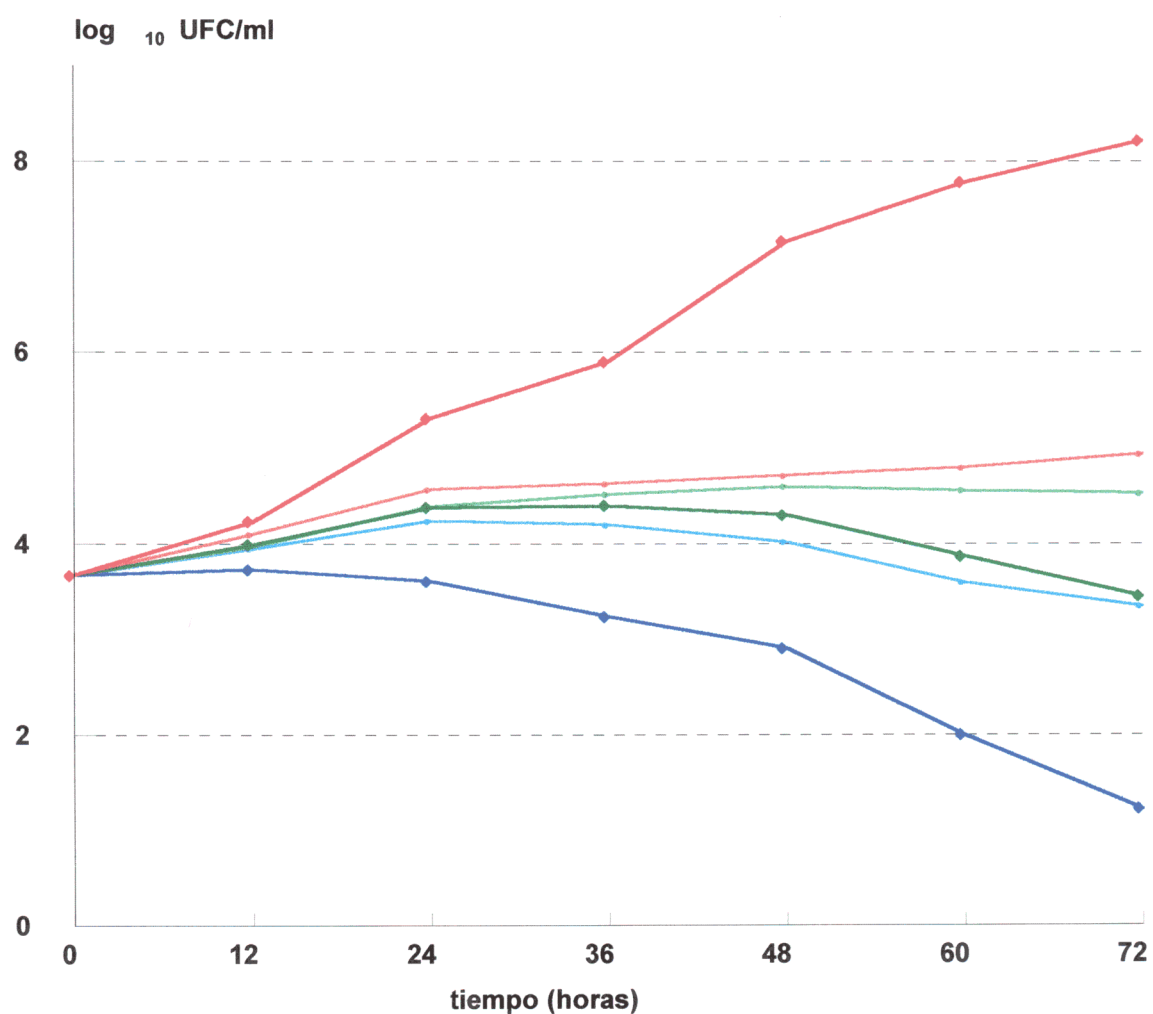
**FIGURA 33.-** Curva de letalidad de *Cryptococcus neoformans* tratado con 64 y 100 µg/ml de 5FC y expuesto al 10% de suero humano. (♦ = control; ● = control con suero; ♦ = 64; ● = 64 con suero; ♦ = 100 ● = 100 con suero).



**FIGURA 34.-** Curva de letalidad de *Cryptococcus neoformans* tratado con 1 y 4 µg/ml de KTZ y expuesto al 10% de suero humano. (♦ = control; ● = control con suero; ♦ = 1; ● = 1 con suero; ♦ = 4; ● = 4 con suero).



**FIGURA 35.**-Curva de letalidad de *Cryptococcus neoformans* tratado con 16 y 32 µg/ml de FLU y expuesto al 10% de suero humano. (♦ =control; ● = control con suero; ◆ = 16; ● = 16 con suero; ◆ = 32; ● = 32 con suero).



**FIGURA 36.**-Curva de letalidad de *Cryptococcus neoformans* tratado con 0,125 y 4 µg/ml de UK y expuesto al 10% de suero humano. (♦ =control; ● = control con suero; ◆ = 0,125; ● = 0,125 con suero; ◆ = 4; ● = 4 con suero).

## ***DISCUSIÓN***

## **1.- INFLUENCIA DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE FUNCIONES DE LOS LEUCOCITOS PMN.**

El descubrimiento de la penicilina en 1929 marcó el comienzo de una nueva era en el tratamiento de las enfermedades infecciosas **(191)**. Desde entonces, los antibióticos se han convertido en los agentes farmacológicos más utilizados en la práctica clínica **(192)**. No obstante, a lo largo de los años se ha incrementado el número de microorganismos que han conseguido eludir la acción de estos agentes antiinfecciosos, y el incremento y expansión de las resistencias de bacterias, levaduras y parásitos a los antimicrobianos más utilizados, constituye actualmente uno de los principales problemas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Cuando los agentes antimicrobianos se emplean como terapia frente a una infección, su acción se desarrolla en el conjunto de las interacciones existentes entre el microorganismo y los mecanismos de defensa del hospedador. De esta manera, la activación de los antibióticos no afecta únicamente al microorganismo diana, sino que además puede interferir en la acción defensiva del sistema inmune. Además, los propios sistemas defensivos del organismo infectado son capaces de alterar la actividad antimicrobiana del fármaco **(193-199)**.

De aquí nace la necesidad de conocer a fondo la influencia que los fármacos antimicrobianos ejercen sobre las defensas del hospedador, así como el posible efecto del sistema inmune sobre la acción microbicida del antibiótico. Así, se llegará a una mayor comprensión de las interacciones existentes entre los factores que concurren en un proceso infeccioso, como un paso más para emplear en cada caso la terapia más adecuada.

Desde que hace más de 40 años se publicó la primera investigación sobre la modulación del sistema inmune por los antimicrobianos **(200)**, se ha incrementado

considerablemente el interés sobre las interacciones existentes entre el agente terapéutico y el sistema defensivo del hospedador. Actualmente, un gran número de estudios se basan en la búsqueda de una posible acción sinérgica entre ambos elementos, así como la influencia de la misma en el destino final del microorganismo (201).

En el presente trabajo, se ha abordado el estudio de la influencia de los cuatro antifúngicos más utilizados en clínica (anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol y fluconazol), y una nueva molécula antimicótica, aún en vías de comercialización (UK 109, 496), sobre las funciones microbicidas más importantes de los leucocitos PMN.

Los leucocitos PMN constituyen la población celular más importante, cualitativa y cuantitativamente, dentro del sistema inmune frente a las infecciones bacterianas y micóticas agudas (1) (5) (6) (202). Conforman la primera línea defensiva del organismo ante cualquier invasión, una vez que el agente patógeno ha sobrepasado las barreras naturales, como el revestimiento mucocutáneo (1) (5) (6) (35) (203). Y es en especial sobre estas células, los leucocitos PMN, sobre las que más claramente se han observado los efectos de los antimicrobianos (204).

Al contrario que los fármacos antibacterianos, únicamente un pequeño número de antifúngicos se encuentra disponible en la clínica. AMB ha constituido la única terapia ante las infecciones micóticas durante más de 20 años. Posteriormente, se desarrollaron nuevas moléculas, como 5FC, y los azoles, como los imidazoles miconazol y KTZ. La proliferación de enfermedades que atacan directamente al sistema inmune ha inducido la aparición de antimicóticos con escasa o nula toxicidad para el hospedador, como los azoles triazólicos itraconazol y FLU (106) (107). Actualmente, se encuentra aún en fase de investigación clínica un nuevo triazol, UK 109,496, con propiedades físico-químicas muy similares a las de FLU.

Por otra parte, así como los fármacos antibacterianos han sido objeto de

numerosas investigaciones dentro del campo de la inmunomodulación, los antifúngicos se han estudiado mucho menos, en general en todos sus aspectos, y especialmente sus efectos sobre los leucocitos PMN.

Las micosis sistémicas se dan normalmente en los pacientes inmunocomprometidos o con las defensas gravemente dañadas (205). El éxito del tratamiento de dichas patologías depende en gran medida de una buena respuesta por parte del sistema inmune; si éste se ve alterado de alguna manera por el antifúngico, aumentará la complejidad del tratamiento (205).

AMB es el antifúngico que más se ha investigado en lo relativo a su influencia sobre las funciones de los PMN. Algunos investigadores han demostrado efectos inmunosupresores del fármaco sobre los neutrófilos (206-209). Otros han sugerido que AMB estimula ciertas actividades de los leucocitos PMN (210-211).

Las investigaciones llevadas a cabo con KTZ muestran resultados contradictorios; algunos autores (212-215) sostienen que el antifúngico inhibe la mayoría de las funciones de los PMN, y otros en cambio han demostrado que no produce ningún efecto sobre las mismas (216). Lo cierto es que KTZ ha mostrado un nivel de toxicidad que lo hace poco adecuado como terapia frente a enfermedades inmunosupresoras (96) (102) (107) (217) (218).

Por lo resumido en los trabajos publicados, 5FC no ha demostrado efectos negativos ni positivos sobre las funciones defensivas de los PMN, (206) (213) (219) (220), aunque diversos estudios han asociado al antifúngico con la aparición de aplasia en la médula ósea (86-89), necrosis hepática (221) y perforación intestinal (222) (223). Su toxicidad, junto con el nivel de resistencia que genera, hace de 5FC un fármaco escasamente útil como terapia única en el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos (161).

La necesidad de antifúngicos sin efectos secundarios adversos y con amplio espectro de actividad antimicótica condujo a la aparición de FLU. Se han publicado



muy pocas investigaciones acerca de sus efectos sobre los leucocitos PMN, aunque dichos estudios apuntan a una escasa o nula toxicidad **(66-68) (224) (225)**.

La baja actividad de FLU frente a algunos hongos causantes de patologías graves, como *Aspergillus*, ha inducido la investigación de nuevas moléculas similares, con mayor espectro de actividad. Suponemos que UK 109,496 vendrá a cubrir el hueco que FLU no puede llenar, si bien aún es pronto para afirmarlo. Como es obvio, nuestros resultados con dicho antifúngico no han podido ser contrastados hasta el momento con ninguna publicación.

## **1.1.-DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA.**

### **1.1.1.- EXTRACCIÓN DE LEUCOCITOS PMN.**

A la hora de estudiar las funciones de un tipo determinado de células de la sangre, es necesaria la utilización de una técnica de separación eficaz, que al mismo tiempo evite cualquier elemento tóxico para la célula en estudio.

El método utilizado en nuestro estudio se basa en el descrito por Eggleton y colaboradores (177), denominado de **centrifugación diferencial**.

Existen otras maneras de separar los leucocitos PMN del resto de las células sanguíneas, como la sedimentación de los neutrófilos por adición de dextrano solo o junto con metrizoato de sodio (técnica de Ficoll-Hypaque).

Cuando se emplean técnicas de separación de leucocitos PMN mediante polímeros, como el dextrano o el método de Ficoll, pueden surgir complicaciones que interfieran con la buena marcha del experimento:

- **Viabilidad y funcionalidad celular.**

El dextrano modifica las funciones celulares de diferentes maneras: estimula el

metabolismo celular, se une irreversiblemente a la célula, alterando las cargas superficiales (177). Además, el aislamiento de PMN con el método Ficoll puede inducir la pérdida de adhesividad celular a superficies de plástico o cristal (177).

- Contaminación.

Algunos investigadores (226) (227) han encontrado contaminaciones de lipopolisacárido bacteriano en los kits de Ficoll-Hypaque. Aunque la contaminación de productos de laboratorio es una posibilidad latente, es más grave si implica una alteración de las sustancias manufacturadas que modifique los resultados finales.

La técnica de Eggleton se basa en la lisis de los eritrocitos con cloruro amónico frío ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  a  $4^\circ\text{C}$ ), y sucesivas centrifugaciones que recogen un precipitado de leucocitos PMN en perfectas condiciones. La pureza obtenida superó siempre el 90%, y aunque existió un mínimo porcentaje tanto de linfocitos y monocitos como de basófilos y eosinófilos, éstas células no afectaron a la correcta funcionalidad de los PMN (177).

Por otro lado, dicha técnica posee la ventaja de que los PMN no permanecen expuestos a estímulos químicos. Algunos autores (228) han observado que el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  isotónico altera el equilibrio electrolítico de la célula; no obstante dicho efecto revierte al resuspender los neutrófilos en medio fisiológico (177).

### **1.1.2.- ESTUDIO DE LA ADHERENCIA A PLÁSTICO Y A NYLON.**

La adherencia de los leucocitos PMN al endotelio (marginación) constituye uno de los primeros acontecimientos en la respuesta de las células a los estímulos inflamatorios (6) (229) (230).

En nuestro trabajo, hemos utilizado el plástico como sustrato inerte al que los

PMN se adhieren normalmente, para correlacionar la adhesividad de las células a los componentes tisulares (endotelio, microorganismo patógeno) *in vivo*. Posteriormente, se realiza un recuento de los neutrófilos que han quedado adheridos a los pocillos de plástico de las placas MIF **(180) (231)**.

Tras la marginación, los leucocitos PMN abandonan los vasos sanguíneos, para lo cual experimentan una deformación en su membrana; dicho fenómeno se denomina **diapédesis (1) (6)**. En el presente trabajo, hemos seguido el método de McGregor **(12)** para evaluar la deformabilidad de los PMN; si las células son capaces de alterar su forma, podrán atravesar la fibra de nylon, y por gravedad, formarán parte del efluente recogido.

La utilización del nylon se explica porque los leucocitos PMN no se adhieren a dicho material, pudiendo atravesar las fibras sin pegarse a ellas. Si las células son incapaces de deformarse, quedarán enredadas entre el nylon, pero nunca adheridas.

### **1.1.3.- ESTUDIO DE LA MOVILIDAD ESPONTÁNEA Y LA QUIMIOTAXIS.**

Una vez que los leucocitos PMN abandonan el torrente circulatorio, se dirigen a través de los tejidos hacia el foco donde está localizada la infección o inflamación, en virtud de un gradiente de sustancias quimiotácticas (complemento C5a, leucotrienos, FMLP, proteínas desnaturalizadas entre otros**(1) (4-6)**).

De entre las 2 técnicas más sencillas descritas para el estudio *in vitro* del movimiento, el método del gel de agarosa y cámara de Boyden, hemos optado por éste último.

La cámara de Boyden **(30) (183) (184)** está diseñada específicamente para este tipo de estudios, proporcionando una mínima manipulación técnica. El método del gel de agarosa **(31)** implica el uso de material de laboratorio con finalidades diferentes para las que está diseñado, induciendo a mayor error.

Además, la cámara de Boyden facilita y hace más reproducible la cuantificación de la respuesta celular y permite, al igual que la fibra de nylon, conocer las alteraciones de la deformabilidad de los fagocitos en su desplazamiento a través de los poros del filtro utilizado (232).

A pesar de las mencionadas ventajas, la técnica de Boyden es de difícil estandarización, principalmente por la variabilidad del filtro (233) y homogeneización del número de células utilizado (234). Sin embargo, en nuestro trabajo estos inconvenientes quedaron anulados al emplear muestras control, sujetas al mismo error que las tratadas.

Las dos diferencias existentes entre la medida de la movilidad espontánea y de la quimiotaxis son el tamaño de poro del filtro y el uso o no de sustancia quimioatrayente.

El poro del filtro utilizado en los ensayos de movilidad espontánea es mayor, ya que facilita el movimiento de las células sin la existencia de un gradiente quimiotáctico. Por otra parte, los PMN se movilizan masivamente en la quimiotaxis, debido a la estimulación de la movilidad, y un tamaño de poro grande dificultaría la tarea de contar las células.

El quimioatrayente empleado en el presente estudio fue caseína desnaturalizada. Su acción quimiotáctica se basa en que forma parte de estructuras orgánicas de desecho que es preciso limpiar del organismo, atrayendo de esta manera a los leucocitos (18). La elección de la caseína como sustancia quimiotáctica se debió a la reproducibilidad de sus resultados. En ensayos realizados previamente en nuestro laboratorio se utilizó zymosán, que posteriormente desechamos por su mayor variabilidad.

La caseína se compone de una mezcla de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseína. Su actividad quimiotáctica depende, de manera inversamente proporcional, de la concentración del catión  $\text{Ca}^{2+}$ . Si ésta disminuye, las propiedades quimioatrayentes de la caseína

se incrementan (14).

Para cuantificar la quimiotaxis y la movilidad espontánea, los dos métodos más utilizados son:

- Recuento del número de células que llegan a la cara inferior del filtro después de un tiempo prefijado de incubación en las cámaras.
- Otra técnica consiste en medir la distancia que recorren los leucocitos PMN en el interior del filtro en un tiempo determinado, mediante recuento con el tornillo micrométrico.

En la primera valoración, utilizada en nuestros ensayos, es más sencillo identificar las células que se cuentan, y al mismo tiempo resulta más satisfactorio para determinar la influencia de los factores quimiotácticos (14).

El tiempo que las cámaras permanecieron en incubación, igual en los ensayos de movilidad espontánea y de quimiotaxis, fue de 3 horas. Algunos autores han señalado (14) (15) que dicho tiempo es el idóneo para observar el mayor número de células en la cara inferior del filtro. Tiempos menores proporcionan índices de movilidad espontánea y de quimiotaxis muy por debajo de los auténticos, y con más de 3 horas de incubación pueden perderse células por caída en el compartimento inferior de la cámara de Boyden (15).

#### **1.1.4.-ESTUDIO DE LA FAGOCITOSIS Y LA MUERTE INTRACELULAR.**

Una vez que la célula fagocítica se encuentra frente a frente con la partícula extraña (en nuestro caso, el microorganismo invasor), pone en marcha sus mecanismos microbicidas. Éstos comienzan, en primer lugar, con la adherencia del microorganismo a la membrana del leucocito, tras lo cual la partícula es englobada por la célula, en la denominada fagocitosis propiamente dicha; posteriormente, en el PMN se desencadenan una serie de reacciones químicas ya mencionadas,

destinadas a eliminar al microorganismo (muerte intracelular) y a digerirlo (1) (4-6) (235).

En concreto en nuestro trabajo, hemos evaluado los efectos de los cinco antifúngicos sobre los procesos de fagocitosis y de muerte intracelular.

El primer problema que se nos planteó, a la hora de diseñar el experimento, fue que el microorganismo utilizado no se viera afectado por ninguno de los fármacos estudiados. Por ello, tuvimos que descartar la utilización de *Candida albicans*, levadura estándar en la mayoría de los ensayos con antibacterianos.

El uso de una bacteria implica, de entrada, una mayor dificultad a la hora de contabilizar las células fagocitadas. Uno de los métodos más utilizados es la medida de la liberación de radiactividad de células que fagociten bacterias marcadas (42) (236) (237). Esta técnica, así como la tinción con sustancias visibles a rayos ultravioleta, presenta el inconveniente de ser muy costosa de realizar, pudiendo obtenerse los mismos resultados con métodos más sencillos y económicos.

La valoración del efecto global del fármaco en el proceso fagocítico se puede realizar también mediante la determinación de los cambios en la quimioluminiscencia o producción de radicales, es decir, a partir de medidas indirectas del proceso. No obstante, los resultados obtenidos pueden no ser del todo correctos, ya que pueden ser producto de la interacción del fármaco con algunas de las complejas reacciones bioquímicas del proceso (238). Por ejemplo, la absorción de luz por rifampicina produce un descenso en la respuesta de quimioluminiscencia (239).

Algunos autores consideran que la técnica de Van Furth, basada en el recuento de bacterias no fagocitadas o muertas, no distingue en los resultados finales entre los microorganismos fagocitados y los que simplemente se encuentran adheridos al PMN, pero no en su interior (11) (34). Sin embargo, consideramos que el proceso de fagocitosis que queremos estudiar comienza precisamente cuando la

bacteria se adhiere al microorganismo; a partir de aquí, se desencadenan una serie de fenómenos y reacciones irreversibles, cuyo final es la muerte de la bacteria.

Por otra parte, la similitud entre la metodología empleada para los ensayos de fagocitosis y los de muerte intracelular, implica una mayor homologación de los resultados finales, que si se utilizasen 2 técnicas distintas para valorar 2 fenómenos que forman parte de un único proceso, el de la muerte bacteriana.

La utilización de la bacteria *S. aureus* se debió a la gran accesibilidad de la misma para ser fagocitada por los leucocitos PMN (172). Estuvo presente en las pruebas de fagocitosis y de muerte intracelular en una proporción de 2:1 de bacteria-PMN; de esta manera, nos aseguramos que tanto las tasas de fagocitosis como las de muerte intracelular no fueran tan elevadas como para no obtener viables suficientes en los recuentos de las muestras control.

#### **1.1.5.- CONCENTRACIONES DE ANTIFÚNGICOS VALORADAS.**

En todos los casos, se utilizaron 4 concentraciones diferentes para cada antifúngico: una muy baja; la siguiente en una cantidad que pueda encontrarse en suero tras una dosis estándar; una tercera próxima al límite de la toxicidad específica de cada antifúngico, y la más alta muy por encima de dicho nivel tóxico, para evaluar los efectos de todos los fármacos sobre los leucocitos PMN.

### **1.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.**

#### **1.2.1.- ANFOTERICINA B.**

Entre los antifúngicos más utilizados, AMB es el que ha inducido la publicación de mayor número de trabajos (179).

El éxito del tratamiento de las micosis sistémicas, producidas sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, depende en gran medida del buen funcionamiento

del sistema inmune. AMB genera escasa resistencia entre las levaduras patógenas y posee el más amplio espectro de acción **(50) (58) (240) (241)**; sin embargo, es también el fármaco antimicótico causante de los efectos secundarios más graves y numerosos **(50) (65) (241)**, por lo que actualmente se está investigando en la combinación de su efectividad antifúngica con moléculas que disminuyan su toxicidad **(242-244)**. Dicha toxicidad se corrobora con los numerosos estudios llevados a cabo con AMB y leucocitos PMN. De esas investigaciones, se llega a la conclusión de que, a pesar de la variedad existente en la metodología empleada, la unanimidad en los resultados es casi completa. La inmensa mayoría de los investigadores han encontrado actividad inmunosupresora de AMB frente a los leucocitos PMN **(205-209) (213) (219) (245-248)**. Muy pocos han demostrado que el antifúngico estimula las funciones de los PMN **(210) (211) (249)**.

La viabilidad de los leucocitos PMN, incubados antes de los ensayos con cada uno de las 4 concentraciones del antifúngico estudiado, fue siempre mayor del 90%. Podría pensarse, y de hecho algunos autores lo han encontrado así, que el PMN no sobrevive a concentraciones de AMB tan altas como 100 µg/ml **(179) (248)**. Sin embargo, desde el momento en que la célula es capaz de adherirse al plástico, podemos deducir que ha sobrevivido a dicha concentración.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que AMB no influye en absoluto en la adherencia de los PMN al plástico; por lo mismo, es lógico pensar que ninguna concentración del antifúngico disminuye la viabilidad celular.

La mayoría de los investigadores que trabajan con AMB y leucocitos PMN pasan por alto la valoración de la adherencia celular a un sustrato inerte. No obstante, Van der Auwera y colaboradores **(248)** encontraron que el antifúngico disminuía significativamente la adherencia de los PMN al plástico a concentraciones iguales o superiores a 5 µg/ml, si bien la metodología empleada es significativamente diferente a la utilizada por el resto de los estudios realizados.

Lorente **(250)**, sin embargo, utilizando otro sustrato inerte como es el vidrio,



demostró que AMB no influía ni en la viabilidad ni en la adherencia del PMN a sustratos inertes, incubados incluso con 500 µg/ml.

Como ya ha sido expuesto anteriormente, y en sincronización con los estudios publicados por diferentes autores, nuestros resultados demuestran que AMB no influye en la adherencia al plástico de los leucocitos PMN.

La técnica de la adherencia al nylon valora, mejor que ningún otro ensayo, la capacidad del PMN para deformar su membrana, y de esta manera acceder al exterior de los vasos sanguíneos para dirigirse al foco infeccioso **(6) (12) (229) (246) (251)**.

En nuestros resultados se observa un incremento paulatino de la tasa de adherencia a nylon de los leucocitos PMN, directamente proporcional a la concentración de AMB con que se han incubado las células. Esto significa que, a mayor concentración de AMB, la célula encuentra más dificultades para avanzar siguiendo la fuerza de la gravedad, a través de la fibra de nylon, y por tanto se recogen menos neutrófilos en el efluente. Lo que ocurre en realidad es que el PMN es incapaz de deformarse para atravesar las fibras, y por tanto se queda atrapado entre ellas, en mayor medida cuando ha sido incubado con mayores concentraciones de AMB.

Marmer y colaboradores **(207)** encontraron que la adherencia de los leucocitos PMN tratados con diferentes concentraciones de AMB (de 1 a 50 µg/ml) disminuía a concentraciones bajas, aunque no de manera significativa, para después incrementarse significativamente a partir de 20 µg/ml. En un trabajo posterior, Yasui y colaboradores **(246)** también encontraron un incremento significativo a partir de concentraciones similares de AMB.

Considerando que el mecanismo que induce la diapédesis de los PMN se encuentra muy relacionado con el del movimiento, es posible explicar de manera conjunta los resultados obtenidos para movilidad espontánea, quimiotaxis y

adherencia a nylon.

Los resultados que hemos obtenido en los ensayos realizados para evaluar la influencia de AMB sobre la movilidad espontánea y la quimiotaxis de los leucocitos PMN demuestran que el antifúngico disminuye los índices de dichas funciones proporcionalmente a la concentración de AMB. El descenso es significativo a partir de 10  $\mu\text{g/ml}$  en la quimiotaxis y con 100  $\mu\text{g/ml}$  de AMB en el caso de la movilidad espontánea. Dichos resultados coinciden con los de la mayoría de los autores **(205-209) (213) (219) (245-248)**

Si bien la influencia negativa más significativa de AMB sobre la movilidad y la adherencia al nylon de los PMN se produce a concentraciones muy por encima del nivel terapéutico, es un hecho que los índices de dichas funciones ya experimentan un descenso a partir de la concentración más baja utilizada, es decir, 0,1  $\mu\text{g/ml}$ .

El mecanismo de acción de AMB frente a las células fúngicas se basa en la unión de la molécula al ergosterol presente en la membrana de la levadura. De esta manera, se originan poros en la membrana, incrementándose su permeabilidad y produciendo la lisis celular. **(65) (66)**.

Diversos estudios realizados sobre la farmacocinética de AMB han puesto de manifiesto que, aunque el antifúngico presenta una mayor afinidad por el ergosterol de la membrana fúngica **(66) (252-254)**, administrada por vía intravenosa se une al colesterol de la membrana de las células de mamífero, siendo ésta la causa principal de la nefrotoxicidad del antifúngico **(255-259)**.

Se sabe que el grado de fluidez de la membrana de la célula de mamífero depende en gran medida del nivel de colesterol existente en la bicapa lipídica **(246) (260-262)**. Así, una posible explicación del descenso de la movilidad y de la deformabilidad de la membrana de los PMN podría ser que la unión de AMB al colesterol de la membrana de los leucocitos induce una pérdida de la estabilidad fluida, con la consiguiente rigidez e impedimento para moverse y deformarse. De

esta manera, AMB influye negativamente tanto en la movilidad y quimiotaxis del PMN como en la capacidad de deformar su membrana, hecho éste directamente relacionado con la adherencia celular a la fibra de nylon. Además, y en concreto en el caso de la quimiotaxis, se sabe que AMB induce un estado de baja afinidad de los quimiorreceptores de membrana de los PMN (246).

Por último, los datos obtenidos por Berliner (263) demuestran que concentraciones terapéuticas de AMB producen la agregación de los PMN. En preparaciones de leucocitos y AMB llevadas a cabo en nuestro laboratorio, hemos podido comprobar dicho fenómeno, sin que ello implique una pérdida de la viabilidad del PMN. No obstante, la agregación de los leucocitos PMN sí se encuentra en relación inversa con su adherencia al nylon; el agregado celular constituye un volumen demasiado grande para atravesar la red de fibras de nylon. Este hecho se refleja en un aumento de la tasa de adherencia al nylon de los PMN, tal y como muestran nuestros resultados.

En las pruebas de fagocitosis y de muerte intracelular realizadas con leucocitos PMN y AMB, obtuvimos un descenso en los índices, que fue estadísticamente significativo con 100 µg/ml en fagocitosis, y a partir de 10 µg/ml con la muerte intracelular.

La muerte intracelular experimentó un descenso mucho más acusado que la fagocitosis, cuyos valores descendieron más lentamente, quedando esta función menos alterada por la AMB que la actividad bactericida.

La mayoría de los autores coinciden en postular una supresión de la fagocitosis y muerte intracelular en los PMN, producida por la AMB (206-209). La razón por la que este antifúngico inhibe la capacidad fagocítica de los PMN a altas concentraciones no parece estar aún muy clara, pero podría estar relacionada con el mecanismo de acción de AMB frente a la membrana celular (179), ya que una disminución de la deformabilidad de la membrana plasmática implica una mayor dificultad para la fagocitosis.

En cuanto a los mecanismos microbicidas, se sabe que AMB inhibe la respuesta metabólica oxidativa del PMN **(179) (219)**, incluso a niveles al límite de los aconsejados en tratamiento (5 µg/ml). Teniendo en cuenta que la muerte intracelular de un microorganismo por un leucocito PMN se encuentra estrechamente relacionada con el oxígeno, parece claro que la capacidad microbicida pueda descender en los leucocitos tratados con AMB. Aunque la inhibición sólo es significativa a partir de 10 µg/ml, llama la atención que con 100 µg/ml la acción microbicida queda prácticamente anulada.

### **1.2.2.- 5-FLUOROCITOSINA.**

Si anteriormente hemos puesto de manifiesto la escasez de trabajos de inmunomodulación que existen con antifúngicos, hemos de decir que 5FC es el menos estudiado en este aspecto.

Nuestros resultados coinciden con la totalidad de las investigaciones publicadas, en las que no se observan cambios significativos en la actividad de los PMN en ninguna de las funciones examinadas **(179) (213) (219) (220) (264)**.

En el pasado, diversos trabajos han subrayado la existencia de efectos secundarios indeseables como consecuencia de la administración de 5FC, especialmente aplasia en la médula ósea, trombocitopenia y leucopenia **(86) (88) (89)**. Sin embargo, las investigaciones de inmunomodulación con PMN revelan una falta de influencia del antifúngico en las células.

Aunque aún no está claro el por qué de los citados efectos secundarios frente a la falta de toxicidad de 5FC en contacto directo *in vitro* con los PMN, podrían darse varias razones que matizan la citada influencia negativa del antifúngico:

- La mayoría de los estudios de toxicidad de 5FC se refieren al antifúngico administrado por vía oral. Se ha demostrado que la microflora del tracto intestinal convierte 5FC en 5FU, el cual es el responsable directo de los

efectos tóxicos producidos en la médula ósea y en las células sanguíneas **(73) (265) (266)**.

- Otra de las causas reside en la administración conjunta con AMB, la cual hace más necesaria la monitorización de los niveles séricos de 5FC que si se utilizase el antifúngico como terapia única **(66)(79)**.
- Por último, se sabe que las células de mamífero no poseen (o en muy baja proporción) la actividad enzimática **citosín-desaminasa**, enzima responsable de la conversión de 5FC a 5FU, el cual es el producto último causante de la toxicidad producida en la médula ósea y la producción de células sanguíneas **(66)**. Por tanto, es posible que 5FC (siempre a concentraciones superiores a 100 µg/ml) actúe únicamente sobre la **producción** de células sanguínea, pero no directamente sobre las funciones leucocitarias.

### **1.2.3.- KETOCONAZOL**

Tras su síntesis, en la década de los años 70, KTZ se convirtió en el primer agente antifúngico imidazólico de administración oral, viniendo a llenar, al menos parcialmente, el vacío que los efectos secundarios tóxicos de AMB dejaba en la terapia antifúngica **(96)**.

Los trabajos publicados sobre la influencia de KTZ en las funciones de los PMN son escasos y contradictorios entre sí, aunque posiblemente sea debido tanto a la heterogeneidad de la metodología empleada como a las diferencias entre las dosis utilizadas del antifúngico.

En nuestros resultados podemos destacar la inhibición del movimiento de los leucocitos PMN previamente incubados con KTZ, si bien los valores fueron estadísticamente significativos a partir de 5 µg/ml. Dicha concentración se considera en el límite superior de las dosis administrables al organismo humano.

Por otro lado, KTZ indujo un comportamiento, al menos curioso, en la adherencia a nylon de los leucocitos PMN; aunque carente de significación estadística, observamos una disminución en los índices de las células incubadas con 5 µg/ml de KTZ, para incrementarse las cifras con 50 µg/ml. Este contraste puede ser atribuible al comportamiento paradójico y desigual que pueden presentar algunas células expuestas a altas concentraciones de ciertos fármacos.

Varios autores han encontrado que, al igual que los resultados obtenidos en el presente trabajo, KTZ inhibe de forma drástica las funciones de movilidad de los leucocitos PMN (movilidad espontánea y quimiotaxis), aunque no influye en el resto de la actividad leucocitaria (212) (214) (267) (268).

La razón por la cual muestra dicha inactivación en la movilidad podemos encontrarla en el propio mecanismo de acción del antifúngico. Tanto los imidazoles como los triazoles inhiben la conversión de lanosterol a ergosterol en la membrana fúngica mediante su unión al citocromo p-450 (102). Sin embargo, KTZ muestra poca selectividad por el enzima fúngico con respecto a su homólogo presente en las células de los mamíferos (102) (103) (124) (269) (270), y de la misma forma que impide la síntesis del ergosterol de la membrana fúngica, se ha demostrado que inhibe la conversión de lanosterol a colesterol en las células de mamífero (102) (268) (271-274). De esta manera, KTZ interviene directamente en la fluidez de la membrana. Si tenemos en cuenta que el miconazol ha demostrado influir negativamente en la movilidad de los PMN precisamente por su interferencia en la fluidez de la membrana (246), y que el comportamiento del miconazol y de KTZ en cuanto a la inhibición de la síntesis del colesterol es idéntico (274), es posible que el movimiento de los leucocitos PMN se vea impedido por una alteración en la deformabilidad de la membrana, (275) debido al desequilibrio de los lípidos. De hecho, en la enfermedad denominada hemoglobinuria nocturna, entre otras patologías, se da una anomalía en los lípidos de membrana, la cual conduce a un descenso en la quimiotaxis de los leucocitos PMN (276).

Por otra parte, y en relación directa con la conversión del lanosterol en

colesterol, se sabe que KTZ bloquea la síntesis de leucotrienos (94), sustancias quimiotácticas importantes en el proceso inflamatorio. No obstante, y debido a que nuestros experimentos se llevaron a cabo *in vitro*, optamos por la alteración de la fluidez de la membrana como una explicación para el drástico descenso de la movilidad espontánea y la quimiotaxis de los leucocitos incubados con KTZ (5 µg/ml).

Además, el marcado ascenso del índice de adherencia a nylon en los PMN incubados con 50 µg/ml, aunque no significativo, podría estar relacionado directamente con la alteración de la fluidez de membrana producida por altas concentraciones de KTZ, y que también afecta a su movilidad.

#### **1.2.4.- FLUCONAZOL.**

Fluconazol constituye actualmente la solución terapéutica más utilizada en el tratamiento de infecciones fúngicas en pacientes inmunodeprimidos, precisamente por su escasa o nula toxicidad, frente a los efectos adversos de AMB y KTZ (65) (66) (102) (179) (205) (225) (267) (268) (277) (278).

Los estudios publicados sobre la influencia de FLU sobre las funciones de los leucocitos PMN son también muy escasos, aunque existe unanimidad en las conclusiones: FLU no ejerce ningún efecto sobre la actividad leucocitaria (65) (66).

Nuestros resultados concuerdan con dichos trabajos; ninguna de las funciones estudiadas de los PMN se vio alterada significativamente por las diferentes concentraciones de FLU.

Sí se observa un paralelismo en cuanto a la movilidad espontánea y la quimiotaxis: aunque mucho menor, y desde luego no significativo, se dio un descenso en los índices de dichas funciones, al igual que con KTZ. La causa de dicha semejanza podría estar en la similitud del mecanismo de acción de ambos antifúngicos, si bien FLU muestra una afinidad mucho mayor por el enzima P-450 de

la membrana fúngica con respecto al de la membrana de las células de mamífero (102). De esta manera, la interferencia del antifúngico con la fluidez y movilidad de la membrana plasmática de las células de mamífero es prácticamente nula.

#### **1.2.5.- UK 109,496.**

Este nuevo antifúngico triazólico, aún no comercializado, posee una estructura molecular muy semejante a FLU. Sin embargo, según hemos podido comprobar, su influencia sobre las funciones de los leucocitos PMN se parece más a la que muestra KTZ.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que UK induce un descenso concentración-dependiente en los índices de movilidad espontánea y de quimiotaxis, con índices significativamente inferiores en las células incubadas con la máxima concentración (100 µg/ml). Asimismo, la fagocitosis se vio alterada negativamente con dicha concentración de UK.

La falta de datos publicados en este sentido impide contrastar dichos resultados. Sin embargo, podemos apuntar una mayor toxicidad de UK frente a la actividad leucocitaria comparado con lo que mostró FLU. Este hecho podría estar en relación directa con la diferencia existente en la concentración máxima terapéutica admitida, que es mucho más alta para FLU (25 µg/ml) (179) que para UK (6-8 µg/ml) (131). No obstante, la influencia negativa de UK sobre los leucocitos PMN se produjo a una concentración muy por encima de la máxima terapéutica.

#### **1.2.6.- MECANISMOS DE TOXICIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LOS LEUCOCITOS PMN.**

Tal y como aparece reflejado en la TABLA VII, AMB fue el antifúngico que más influencia mostró sobre la actividad leucocitaria. No obstante, ninguna de las funciones estudiadas resultó alterada significativamente y de forma concentración-dependiente a concentraciones fisiológicas del fármaco, sino únicamente a



cantidades supratóxicas. Tal y como se ha desarrollado en páginas anteriores, la explicación de dichas modificaciones la podríamos encontrar en el mecanismo de acción de AMB:

KTZ y UK 109,496 mostraron una influencia similar y negativa sobre el movimiento de los leucocitos (movilidad espontánea y quimiotaxis), si bien, al igual que ocurre con AMB, únicamente afectaron significativamente y de forma concentración-dependiente a dichas funciones con concentraciones tóxicas y supratóxicas. Tal y como sucede en el caso de AMB, y según hemos explicado ya anteriormente, es el propio mecanismo de acción de KTZ el responsable del descenso del movimiento leucocitario. El caso de UK, al tratarse de un antifúngico nuevo aún no comercializado, y poco estudiado, está poco claro. No obstante, la clave podría estar en una mayor afinidad de este fármaco por el colesterol, en detrimento del ergosterol fúngico, a diferencia de FLU y asemejándose a KTZ.

## 2.- INFLUENCIA DEL SUERO SOBRE LA ACCIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A *Cryptococcus neoformans*.

Durante los últimos 50 años, y a lo largo de numerosas investigaciones, se ha obtenido una gran cantidad de información acerca del uso y mecanismo de acción de los fármacos antimicrobianos. Sin embargo, debemos orientar nuestros estudios hacia un mejor entendimiento no sólo de cómo dichos medicamentos actúan contra los microorganismos, sino también acerca de la influencia que los sistemas de defensa del hospedador puedan tener sobre la actividad microbicida del fármaco (279).

El suero, fase líquida de la sangre carente de fibrinógeno (280), representa un papel fundamental en la inmunidad humoral (260), y particularmente en los procesos inflamatorios. Entre sus actividades destinadas a eliminar el microorganismo invasor, podemos destacar tres:

- a) Lisis directa del microorganismo.
- b) Opsonización del microorganismo, la cual facilita su fagocitosis por células especializadas.
- c) Neutralización de las toxinas producidas por el microorganismo (192).

Entre los componentes del suero con función inmunitaria encontramos las proteínas, especialmente las del complemento. Aunque se ha descrito el complemento como el elemento clave en la lisis bacteriana causada por el suero, está demostrado que existen muchos otros factores séricos responsables de la defensa independientes del complemento, como pueden ser las inmunoglobulinas y determinados cationes como el hierro (260).

La incidencia de la criptococosis, hasta hace pocos años una patología relativamente poco frecuente, se ha incrementado considerablemente en los últimos años debido al aumento de pacientes con SIDA (281-283). La levadura oportunista

patógena *Cryptococcus neoformans*, es la causa más importante de meningitis fúngica en todo el mundo (283).

A pesar de ello, *Cr. neoformans* sigue siendo actualmente una levadura poco estudiada *in vitro* si la comparamos con *Candida albicans*, posiblemente porque la longitud de su ciclo vital complica los trabajos. Por ello, así como por la facilidad que supone su recuento en placa (ya que no filamenta en presencia de suero, a diferencia de *C.albicans*), elegimos *Cr. neoformans* como microorganismo patógeno, con el fin de evaluar de qué manera afecta el suero humano a la actividad antimicótica de los cinco antifúngicos del estudio.

## **2.1.- DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA.**

En las condiciones experimentales de los ensayos procuramos guiarnos por las normas del NCCLS; no obstante, en la mayor parte de los experimentos fueron el propio ciclo vital de *Cr. neoformans* y su fisiología los que marcaron las pautas a seguir.

Como medio de cultivo empleamos YNB suplementado con glucosa (YNB-G), como recomienda el NCCLS, en lugar de RPMI 1640 (189). Éste último ha sido utilizado en alguno de los ensayos similares a los nuestros; no obstante, *Cr. neoformans* muestra un crecimiento mucho más lento en dicho medio (284-286).

El tamaño de inóculo utilizado fue de  $1 \text{ a } 5 \times 10^3$  UFC/ml, ya que el NCCLS considera más homogéneos los resultados obtenidos por diferentes autores con tamaños de inóculo pequeños y cercanos a  $10^4$  UFC/ml (189).

Por otro lado, y ante la necesidad de establecer una concentración tipo de cada uno de los antifúngicos, se realizaron pruebas de sensibilidad de *Cr. neoformans* frente a cada fármaco utilizado. En concreto, y ante la falta de estandarización de dichas pruebas, se hallaron las  $IC_{90}$  de la levadura con cada

antifúngico, utilizando la técnica de **macrodilución en caldo** bYNB-G en agitación y lectura a las 72 horas.

Se emplearon dos concentraciones de cada antifúngico; la más baja correspondiente al valor obtenido en la IC<sub>90</sub> (tamaño de inóculo de  $1-5 \times 10^3$  UFC/ml), y la más alta por encontrarse en el límite de toxicidad determinado para el fármaco en cuestión.

La proporción de suero empleada en los ensayos fue del 10%, ya que comprobamos experimentalmente que la utilización tanto del 25% como del 50% no produjo variaciones en el crecimiento de *Cr. neoformans* con respecto al 10%.

Los resultados obtenidos en los ensayos con los diferentes antifúngicos demuestran que existe un gran número de interacciones entre los tres factores estudiados, de entre los cuales hemos valorado las siguientes:

## **2.2.- EFECTO DEL SUERO HUMANO SOBRE *Cr. neoformans*.**

Como uno de los factores fundamentales de la inmunidad humoral, es importante destacar el marcado efecto fungistático que el suero ejerce sobre *Cr. neoformans*. Aunque este hecho es sabido desde los años 50 (287), ni siquiera en los estudios más recientes (190) se ha podido dilucidar cuál o cuáles son los factores séricos que determinan la inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans*.

En experimentos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, se realizaron curvas de letalidad de *Cr. neoformans* con suero normal y suero termoinactivado (56°C durante 30 minutos), para llegar a la conclusión de que las proteínas termosensibles del complemento no afectan al crecimiento de la levadura. Este hecho concuerda con lo encontrado por otros autores (287-289), que descartan al complemento como factor clave en la inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans*. Además, se sabe que existe una relación directa entre la actividad de fijación de

fragmentos IC3b del complemento y la concentración de polisacárido capsular (146).

Diferentes estudios (151) (288) han puesto de manifiesto que el par compuesto por los elementos  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  estimula el desarrollo de la cápsula de *Cr. neoformans*, con el consiguiente retraso en el crecimiento de la levadura; a mayor proporción de  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ , se observa una mayor inhibición del crecimiento.

Es obvio, pues, que frente a determinados factores adversos del medio ambiente, la levadura genera un sistema defensivo, como es el incremento del tamaño capsular, que al mismo tiempo lentifica en gran manera su metabolismo, duplicando o triplicando su tiempo de generación. (289). Entre dichos elementos adversos se encuentra el par  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  presente en el suero humano.

En todas las curvas llevadas a cabo con *Cr. neoformans* y suero humano normal a lo largo de nuestro trabajo, hemos observado que la levadura sufría un considerable retraso en su crecimiento. Las causas aún están por dilucidar.

## 2.3.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Como tónica general, en todas las curvas observamos que el suero añadido a cada antifúngico elevaba el crecimiento de las levaduras por encima de aquéllas que habían sido incubadas únicamente en presencia del fármaco.

### 2.3.1.- ANFOTERICINA B.

En las levaduras tratadas con 0,125  $\mu\text{g/ml}$  de AMB y suero, se observaron tasas de inhibición del crecimiento menores que las obtenidas en las curvas de 0,125  $\mu\text{g/ml}$  de AMB sin suero; a partir de la hora 24, la diferencia fue estadísticamente significativa.

En cuanto a las tasas de muerte, AMB 0,125 produjo un efecto fungicida a partir de la hora 24 y hasta la 60; sin embargo, al añadirle suero, las levaduras experimentaron un crecimiento superior al que tuvieron al ser incubadas únicamente con AMB, y sus tasas de muerte fueron nulas durante las 72 horas que duró el experimento.

Al incubar las levaduras con 4 µg/ml de AMB y con suero, observamos asimismo que su crecimiento superaba al de aquéllas que sólo se trataron con AMB, repitiéndose la significación estadística de las tasas de inhibición de crecimiento y de muerte obtenidas para 0,125 µg/ml.

Es bien sabido que la unión a proteínas séricas que presentan algunos fármacos dificulta su actividad antibacteriana (290-292). En concreto, AMB presenta una unión a proteínas superior al 90% (65). Sin embargo, conociendo el efecto fungistático que el suero ejerce sobre *Cr. neoformans*, deberíamos esperar que, al añadirlo al antifúngico, ambos mostraran una acción sinérgica contra *Cr. neoformans*. No sólo no fue así, sino que, además, las levaduras incubadas con suero y antifúngico crecieron significativamente por encima de aquéllas que únicamente se trataron con el antifúngico.

Como causa de este comportamiento paradójico, podemos señalar a la propia levadura. Como hemos comprobado, el suero induce un retraso en su crecimiento por diversas razones; la fisiología del hongo cambia por completo y sufre una lentificación de su metabolismo, de tal manera que la AMB añadida al suero no es capaz de afectar a la levadura como lo haría sin suero.

### **2.3.2.- 5-FLUOROCITOSINA.**

En las levaduras incubadas con 5FC sin la presencia de suero observamos tasas de inhibición del crecimiento estadísticamente significativas, tanto con 64 como con 100 µg/ml del antifúngico. No obstante, la tasa de muerte de las células fúngicas tratadas con la concentración más baja fue nula a lo largo de las 72 horas de experimento, de lo cual deducimos que, a concentración de 64 µg/ml, 5FC ejerció

un efecto fungistático frente a *Cr. neoformans*. Sin embargo, las levaduras tratadas con 100 µg/ml de 5FC sí experimentaron muerte desde la hora 24, si bien se aprecia una recuperación del crecimiento a partir de la hora 48.

Por tanto, en líneas generales, podemos afirmar que 5FC afectó al crecimiento de *Cr. neoformans*, aunque no fue fungicida.

Cuando añadimos suero humano normal a las levaduras tratadas con 64 µg/ml de 5FC, observamos una reducción de las tasas de inhibición del crecimiento. No obstante, la diferencia de dichos valores con respecto a los encontrados en las levaduras únicamente incubadas con el antifúngico no fue estadísticamente significativa en ningún momento. Este hecho se ve reflejado en la gráfica (**FIGURA 33**), en la que se aprecia que la curva correspondiente a 64 µg/ml y la homóloga de 64 con suero discurren entrecruzándose a lo largo de las 72 horas.

En el caso de las levaduras incubadas con 100 µg/ml de 5FC y las correspondientes con suero se observa idéntica falta de significación estadística en las diferencias, así como el mismo entrecruzamiento en las curvas de la gráfica.

Así pues, podemos deducir que el suero humano normal no ejerció ningún efecto sobre la actividad antimicótica de 5FC frente a *Cr. neoformans*.

Una de las razones a la que podríamos atribuir este hecho es que el efecto de 5FC sobre el crecimiento de *Cr. neoformans* es similar al producido por el suero; así pues, la inhibición del crecimiento causada por 5FC se solapa con la producida por el suero, originando curvas muy similares, sin ningún tipo de diferencia significativa. Cuando se midió el crecimiento de *Cr. neoformans* tratado con 100 µg/ml, tampoco se observaron tasas de muerte superiores a 0 en las levaduras, sino únicamente inhibición del crecimiento, lo mismo que al añadirle suero.

### 2.3.3.- KETOCONAZOL.

Cuando incubamos *Cr. neoformans* con 1 µg/ml de KTZ, observamos tasas de muerte superiores a 0 a partir de la hora 24; de lo cual deducimos que el antifúngico resultó fungicida frente a la levadura. Lo mismo podemos afirmar de la concentración de 4 µg/ml, si bien los índices de muerte fueron superiores, llegando prácticamente al 100%. Por supuesto, obtuvimos significación estadística en ambas concentraciones durante las 72 horas de duración del experimento.

Al añadirle el 10% de suero junto con 1 µg/ml de KTZ a las levaduras, observamos unas tasas de inhibición del crecimiento muy inferiores, estadísticamente significativas, con respecto a las obtenidas con el antifúngico en solitario; en cambio, *Cr. neoformans* únicamente mostró tasas de muerte superiores a 0 en la hora 72 de crecimiento cuando se incubó con 1 µg/ml de KTZ y con suero.

Cuando se trataron las levaduras con 4 µg/ml de KTZ y con suero, se obtuvieron también tasas de inhibición de crecimiento significativamente inferiores a los valores observados al incubar *Cr. neoformans* únicamente con el antifúngico. Sin embargo, no obtuvimos tasas de muerte superiores a 0 hasta la hora 60 de crecimiento.

Es destacable, en primer lugar, el hecho de que KTZ presente un considerable efecto fungicida frente a *Cr. neoformans* a las concentraciones correspondientes a la IC 90, aspecto que no observamos con AMB ni con 5FC. Podría pensarse, según los resultados obtenidos *in vitro*, que KTZ resulta un antifúngico letal para la levadura *in vivo*. Sin embargo, no es así, ya que se ha comprobado que la concentración de KTZ en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con meningitis fúngica desciende por debajo del 1% de la concentración total del fármaco en plasma (65).

No obstante, al añadirle suero al antifúngico, observamos una notable reducción de los efectos de KTZ sobre *Cr. neoformans*; el suero interfiere negativamente con la acción del antifúngico.



Sin embargo, como ya hemos mencionado anteriormente, el suero por sí solo es capaz de modificar el metabolismo de la levadura, de forma que lentifica su crecimiento y aumenta el espesor de su cápsula. Si el fármaco es fungicida, al añadirle suero, la diferencia de crecimiento entre las levaduras tratadas con KTZ y suero respecto a las tratadas sólo con el antifúngico será mayor que si el efecto de éste sobre la levadura es fungistático. Éste es el caso de 5FC, en el cual las respectivas curvas discurren en el mismo margen de crecimiento.

Por tanto, el suero ejerce un efecto sobre *Cr. neoformans* que lo hace más inaccesible para KTZ, como ocurre con AMB. Pero, además, KTZ muestra unas elevadas tasas de muerte que implican que la diferencia de crecimiento de las levaduras incubadas con el antifúngico y el suero sea considerable con respecto a las tratadas con antifúngico únicamente.

#### **2.3.4.- FLUCONAZOL**

Al igual que 5FC, con FLU obtuvimos una CMI relativamente elevada (16 µg/ml) con respecto a los valores observados con AMB, KTZ y UK frente a *Cr. neoformans*.

Sin embargo, estas cifras únicamente han sido empleadas como referencia, ya que, como puede apreciarse en las diferentes curvas, las tasas de muerte y de inhibición del crecimiento no se encuentran en relación directa con la CMI de cada antifúngico.

Las tasas de inhibición del crecimiento muestran cifras similares en FLU y en el resto de los antifúngicos, elevándose hasta el 100% en la hora 72 de experimento. No obstante, la diferencia la marcan los valores correspondientes a las tasas de muerte. Observamos que estas cifras son superiores a 0 en las levaduras incubadas con 16 y 32 µg/ml a partir de la hora 36. Sin embargo, cuando se le añade suero al tratamiento, se aprecia un descenso importante de la mortalidad de las levaduras, al igual que observamos con todos los demás antifúngicos en estudio.

Tal y como se pone de manifiesto en las tablas y figuras (**TABLA XVI y FIGURA 35**), FLU resultó fungicida frente a *Cr. neoformans* a partir de la hora 36, en todas las concentraciones estudiadas salvo 16 µg/ml con suero, en la que la mortalidad de las levaduras se retrasó hasta la hora 60.

Observamos asimismo, que las diferencias de crecimiento obtenidas en las levaduras tratadas con FLU y suero fueron significativamente diferentes con respecto a las incubadas únicamente con FLU a partir de la hora 36 de experimento.

A este respecto, podemos señalar que el suero ejerció un efecto más negativo de lo que podría esperarse sobre un antifúngico con ninguna adherencia a proteínas séricas (**292**). Tal y como hemos visto anteriormente, no existen diferencias significativas entre el crecimiento de las levaduras incubadas con 5FC y suero respecto a las tratadas únicamente con 5FC (**FIGURA 33**) (**TABLAS XI y XII**). Sin embargo, la principal diferencia entre 5FC y FLU es que el primero mostró un efecto fungistático sobre *Cr. neoformans*, mientras que FLU indujo la muerte de las levaduras a partir de una hora determinada de crecimiento. Esta diferencia se refleja en la influencia del suero sobre la fisiología de la levadura; en el caso de un fármaco que tan sólo retrasa el crecimiento, como 5FC, al añadirle suero, el microorganismo experimenta prácticamente el mismo retraso. Sin embargo, cuando el antifúngico es fungicida, como es el caso de FLU, se observa una mayor diferencia en el crecimiento entre las levaduras tratadas con FLU respecto a las que, además, se han incubado con suero, ya que el efecto del suero delimita el crecimiento en una estrecha franja de medio logaritmo.

En resumen, podemos afirmar que el suero añadido al FLU indujo unas diferencias en el crecimiento grandes respecto a las levaduras incubadas únicamente con el fármaco. Este hecho puede ser atribuible, entre otras causas y como ya hemos visto, al efecto fungicida de FLU frente a *Cr. neoformans*.

La inexistencia de publicaciones que traten la influencia del suero sobre la actividad anticriptocócica de los antifúngicos no nos permite contrastar los datos

del presente trabajo. No obstante, existe un estudio reciente con FLU de estas características, en el que se concluye que el suero incrementa la actividad del antifúngico contra *Cr. neoformans* (190). Sin embargo, los resultados no son comparables, ya que las condiciones experimentales son diferentes: el RPMI que se emplea en el citado artículo como medio de cultivo induce un crecimiento muy defectuoso y lento de la levadura, como ya hemos visto. Tampoco aparece referida la CMI de la cepa utilizada, con lo cual los resultados no tienen un punto de referencia tan claro como debería esperarse.

### 2.3.5.- UK 109,496.

UK, antifúngico azólico de reciente síntesis que actualmente se encuentra en fase III de investigación clínica, proporciona el toque de novedad en el conjunto del presente trabajo. Por suerte o por desgracia, en este momento no existen publicaciones que corroboren o contradigan nuestros resultados, con lo cual la comparación es imposible en el caso de este antifúngico.

Lo primero que podemos destacar es que la CMI de UK frente a *Cr. neoformans* fue, junto con AMB, la más baja de todos los antifúngicos del estudio. Por otra parte, los resultados obtenidos con UK fueron similares a los mostrados por FLU. Debemos tener en cuenta que la estructura molecular de UK es muy parecida a la de FLU.

La tasa de muerte de las levaduras incubadas con 0,125 µg/ml de UK únicamente fue superior a 0 en la hora 72 de crecimiento (**TABLA XVIII**). No obstante, las levaduras tratadas con 4 µg/ml de UK mostraron tasas de muerte superiores a 0 a partir de la hora 24 de crecimiento, y junto con KTZ se obtuvieron los valores más altos, cercanos al 100%.

Al añadirle suero a los 0,125 µg/ml de UK, se observó una disminución de las tasas de inhibición del crecimiento, aunque tan sólo significativamente distintas de las correspondientes a las levaduras tratadas únicamente con antifúngico en la hora 72.

Cuando *Cr. neoformans* se incubó con 4 µg/ml de UK, observamos que el antifúngico ejerció un fuerte efecto fungicida sobre la levadura, obteniéndose tasas de muerte cercanas al 100% en la hora 72, y únicamente comparables a las observadas con KTZ. No obstante, al añadirle suero humano a esta concentración, obtuvimos tasas de inhibición de crecimiento de las levaduras significativamente diferentes ya desde la hora 24, con los valores más bajos respecto al resto de los antifúngicos. Este hecho se aprecia en la **FIGURA 36** como una notable diferencia entre las curvas correspondientes a 4 y 4 con suero. Las tasas de muerte obtenidas en las levaduras tratadas con suero y 4 µg/ml de UK únicamente fueron superiores a 0 a partir de la hora 60 (**TABLA XVIII**).

Estos resultados corroboran el hecho de que, si el antifúngico es fungistático frente a *Cr. neoformans*, la diferencia entre el crecimiento de las levaduras tratadas con fármaco únicamente y aquéllas a las que se añadió además el suero, es menor (caso de 0,125 µg/ml), mientras que si el efecto es fungicida, dicha diferencia es mucho mayor (caso de 4 µg/ml).

No podemos hablar, a tenor de los expuesto arriba, de un comportamiento común de los tres antifúngicos azólicos frente a *Cr. neoformans* incubado con suero. Sí parece claro que la influencia de éste sobre cualquiera de los 5 antifúngicos estudiados queda reflejada en las curvas según sea la sensibilidad de la levadura a los fármacos, en el sentido que inhiban su crecimiento (fungistáticos) o bien dicha inhibición reduzca, además, significativamente el número de células por debajo del tamaño de inóculo inicial (fungicidas).

Así pues, y según los resultados que hemos obtenido, estamos en condiciones de afirmar que el suero humano normal afecta negativamente a la actividad antimicótica de los 5 antifúngicos estudiados, pero de manera indirecta. Como hemos podido comprobar, el suero influye sobre el crecimiento de *Cr. neoformans*, de forma que lo retrasa (**287-289**); sabemos que, por una parte, el par  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  presente en el suero humano normal aumenta el espesor de su cápsula y además induce, al menos, que el tiempo de generación de la levadura se duplique (**289**). De esta manera, al antifúngico le cuesta mucho más actuar sobre la levadura.

El grado de adherencia de los antifúngicos a proteínas séricas no parece haber influido de manera determinante en nuestros resultados, teniendo en cuenta que la proporción de suero utilizada en el volumen total de las muestras fue del 10%, y los porcentajes de adherencia a proteínas se establecen siempre considerando una proporción del 100% de suero.

Como conclusión, parece evidente que la clave de la escasa actividad antimicótica del antifúngico unido al suero está en el cambio que éste produce en la fisiología de *Cr. neoformans*, haciendo a la levadura más inaccesible frente a la penetración del fármaco. Por otro lado, la adherencia a proteínas séricas parece no influir demasiado en la acción de los antifúngicos, al menos si lo comparamos con el cambio fisiológico sufrido por la levadura.

## ***CONCLUSIONES***

## 1.- INFLUENCIA DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LAS FUNCIONES DE LOS LEUCOCITOS PMN.

Del análisis de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, podemos concluir que:

1. A concentraciones séricas no tóxicas, ninguno de los 5 antifúngicos indujo alteraciones significativas en las funciones estudiadas de los leucocitos PMN.
2. Hemos demostrado que **anfotericina B** moduló negativamente y de forma concentración-dependiente todas las actividades estudiadas de los leucocitos PMN, exceptuando la adherencia a plástico, que no experimentó ninguna alteración.
3. **Ketoconazol** y **UK 109,496** indujeron un descenso significativo y concentración-dependiente en la movilidad espontánea y en la quimiotaxis de los leucocitos PMN, aunque únicamente a concentraciones tóxicas y en el límite de toxicidad.
4. Por último, hemos de destacar que ni **5-fluorocitosina** ni **fluconazol** influyeron en la actividad de referencia de los leucocitos PMN, con ninguna de las concentraciones utilizadas, actuando de forma concentración-independiente.

## 2.-INFLUENCIA DEL SUERO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE 5 ANTIFÚNGICOS FRENTE A *Cr. neoformans*.

1. Las tasas de inhibición de crecimiento y de muerte de *Cr. neoformans* tratado con **anfotericina B, fluconazol, ketoconazol y UK 109,496** fueron superiores a las obtenidas al añadir el 10% de suero humano a la solución de levadura y antifúngico. El tratamiento de **5-fluorocitosina** y suero no indujo variación en dichas tasas con respecto a las obtenidas en las levaduras expuestas únicamente a 5-fluorocitosina.
2. La modificación inducida por el suero actuó directamente sobre la fisiología de *Cryptococcus neoformans*, de forma que enlenteció su crecimiento a lo largo del tiempo, haciendo a la levadura más inaccesible frente a los antifúngicos.
3. El suero ejerció un efecto protector del organismo hospedador frente a *Cr. neoformans*, disminuyendo el número de UFC/ml. Al añadirle cualquiera de los cinco antifúngicos, aunque en diferente grado, dicho efecto disminuye o desaparece,



## ***BIBLIOGRAFÍA***

1. Staines N, Brostoff J, James K. *Introducing immunology*. 2<sup>nd</sup> edition, London: De Mosby, 1993.
2. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunidad innata y adaptativa*. En: *Inmunología*. 2<sup>a</sup> edición, Barcelona: Editorial Salvat, 1991; 1.1-1.9.
3. Bellanti J. *Inmunología general*. En: *Inmunología*. 2<sup>a</sup> edición, México: Editorial Interamericana, 1981; 23-69.
4. Dale MM. *The neutrophil leukocyte*. En: Dale MM, Foreman JC (eds) *Textbook of Immunopharmacology*. London: Blackwell Scientific Publications, 1984; 36-52.
5. Dick HM, Wilkinson P, Powis S. *The normal immune system*. En: Wilson G, Miles A, Parker MT. *Principles of bacteriology, virology and immunity*. Vol.I 7<sup>th</sup> edition, London 1983; 296-318.
6. Lorente F, Romo A, Muriel M, Salazar V. *Fisiología del sistema fagocítico*. En: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (ed). *Tratado de alergología e inmunología clínica*. 1<sup>a</sup> edición, Madrid: 1986; 155-169.
7. Charo IF, Yuen C, Goldstein MI. *Adherence of human PMN to endothelial monolayers: effects of temperature, divalent cations and chemotactic factors on the strength of adherence measured with a new centrifugation assay*. *Blood* 1985; 65:473.
8. Tonnesen M, Smedly L, Goin A, Henson P. *The microvasculature in inflammation. Interaction between neutrophils and vascular endothelial cells*. *Agents Action* 1982; 11:25.
9. Smith R, Lackie J, Wilkinson OP. *The effects of chemotactic factors on the adhesiveness of rabbit neutrophil granulocytes*. *Exp Cell Res* 1979; 122:169.
10. Smith CW, Hollers JC. *Motility and adhesiveness in human neutrophils*. *J Clin Invest* 1980; 65:804.

11. Gnarp H, Belsheim J. Interaction of antibiotics with granulocytes and lymphocytes. En: Jeljaszewicz J, Pulverer J (eds). Antimicrobial agents and immunity. London: Academic Press, 1986; 131-155.
12. McGregor RR, McCarek EJ, Kefalides WA. Comparative adherence of granulocytes to endothelial monolayers and nylon fibers. J Clin Invest 1978; 61:696-702.
13. Keller HV, Wilkinson PC, Abercombie M, Becker EL, Hirsch JG, Miller ME, Ramsey WS, Sigmon SH. A proposal for the definition of terms related to locomotion of leukocytes and other cells. Clin Exp Immunol 1977; 27:377.
14. Wilkinson PC. Chemotaxis and inflammation. 2<sup>nd</sup> edition, Glasgow: Churchill Livingstone, 1982; 1-25.
15. Keller HV, Wissler JH, Hess HV, Cottier H. Distinct chemokinetic and chemotactic responses in neutrophil granulocytes. Eur J Immunol 1980; 66:97.
16. Becker EL. Chemotaxis. J Allergy Clin Immunol 1980; 66:97.
17. Schiffman E, Corcoran BA, Wahl SM. N-formilmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72:1059.
18. Wilkinson PC. Cellular accumulation and inflammation. En: Dale M, Foreman JC (eds). Textbook of pharmacology. London: Blackwell Scientific Publications, 1984; 217-232.
19. Altman LC. En: Gallin LI, Quie PG (eds). Leukocyte chemotaxis: methods, physiology and clinical implications. New York: Raven, 1978; 267.
20. Gallin JI, Gallin EK, Malechs HL, Crane EB. Structural and ionic events during leukocyte chemotaxis. En: Gallin LI, Quie PG (eds). Leukocyte chemotaxis: Methods, physiology and clinical implications. New York: Raven, 1978. 123.

21. Nishida M, Mine J, Monoyama S, Yokota J. Effects of antibiotics on the phagocytosis and killing of *Pseudomona aeruginosa* by rabbit PMN leukocytes. *Chemotherapy* 1976; 22:203.
22. O'Flaherty JT, Showell HJ, Kreutzer DL, Ward PA, Becker EL. Inhibition of in vivo and in vitro neutrophil responses to chemotactic factors by a competitive antagonist. *J Immunol* 1978; 120:1326.
23. Spilberg I, Melhta J. Demonstrations of specific neutrophil receptor for a cell-derived chemotactic factors. *J Clin Invest* 1979; 63:85.
24. Spilberg I, Handell B, Melhta J, Sullivan T, Simchowitz L. Dissociation of the neutrophil functions of exocytosis and chemotaxis. *J Lab Clin Med* 1978; 92:297.
25. Valone EH, Goetzi EJ. Immunologic release in the rat peritoneal cavity of lipid chemotactic and chemokinetic factors for polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1978; 120:102.
26. Snyderman R, Goetzi EJ. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science* 1981; 213:830.
27. Becker EL. Enzyme activation and the mechanism of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. En: Bellantý JA, Dayton DH (eds). *The phagocytic cell in host resistance*. New York: Raven Press, 1975; 1.
28. Wilkinson PC. Locomotion and chemotaxis of leukocytes. En: Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C (eds). *Cellular immunology 2*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980; 51.1-51.16.
29. Metcalf JA, Gallin JI, Nausef WM, Root RK. *Laboratory manual of neutrophil function*. London: Raven Press, 1986.
30. Boyden SV. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962; 115:453-457.

31. Nelson RD, Quie PG, Simmons RL. Chemotaxis under agarosa. A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol* 1975; 115:1650-1656.
32. Wilton JMA. Microbial interference with inflammation and phagocyte function. En: O'Grady F, Smith H (eds). *Microbial perturbation of host defences*. London: Academic Press, 1981; 67-96.
33. Deepe GS, Bullock WE. Immunological aspects of fungal pathogenesis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9 (8): 377-380.
34. Verhoef J, Waldvogel FA. Testing phagocytic cell function. *Eur J Clin Microbiol* 1985;4 (1): 379-391.
35. Spitznagel JK. Microbial interactions with neutrophils. *Rev Infect Dis* 1983; 5 (4): 5806-5822.
36. Mongar JL. Complement and its action. En: Dale MM, Foreman JC (eds). *Textbook of immunopharmacology*. London: Blackwell Scientific Publications, 1984; 147-157.
37. Mims CA. The immune response to infection. En: *The pathogenesis of infectious disease*. 3<sup>rd</sup> edition, London: Academic Press, 1987; 123-151.
38. Stanley D, McGrath BJ, Lamp KC, Rybak MJ. Effect of human serum on killing activity of vancomycin and teicoplanin against *S. aureus*. *Pharmacotherapy* 1994; 14 (1): 35-39.
39. Al Hadithy H, Addison IE, Goldstone AH. A rapid whole blood test for the assessment of neutrophil phagocytosis and killing. *J Clin Lab Hematol* 1981; 3:85.
40. Segal AW, Geisow M, García R, Harper A, Miller R. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 1981; 290:406.

41. Pascual A, López-López G, Aragón J, Perea EJ. Effect of azithromycin, roxithromycin and erythromycin on human polymorphonuclear leukocyte function against *S. aureus*. *Chemotherapy* 1990; 36: 422-427.
42. Van der Auwera P, Husson M, Frühling J. Influence of various antibiotics on phagocytosis of *S. aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 1989; 20:399-404.
43. Van Furth R, Van Zwet TL, Leijh PCJ. In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by human polymorphonuclear and mononuclear leukocytes. En: Weir MD (ed). *Handbook of experimental immunology*. 3<sup>rd</sup> edition, London: Blackwell Scientific Publications, 1978; 32.1-32.19.
44. Van der Auwera P. Interactions between antibiotics and phagocytosis in bacterial killing. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1991; 74:42-48.
45. Klebanoff SJ. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. En: Humbert JD, Milscher PA (eds). *Neutrophil: physiology and pathology*. New York: Grue and Stratton, 1975.
46. Mandell LA. The effects of antibacterial, antiviral and antifungal drugs on the phagocytic, microbicidal and chemotactic functions of the human polymorphonuclear leukocyte. En: Eickenberg HV, Hahn H, Opferkuch W (eds). *The influence of antibiotics on the host-parasite relationship*. New York: Springer Verlag, 1982; 40-85.
47. Elsbach P, Weiss J. A reevaluation of the roles of the O<sub>2</sub>-independent microbicidal systems of phagocytes. *Rev Infect Dis* 1983; 5 (5): 843-918.
48. Borregaard N. Bactericidal mechanisms of the human neutrophil. *Scand J Haematol* 1984; 32:255.
49. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 1984; 73:599.

50. Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B. 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (2): 308-325.
51. Stamm AM, Dismukes WE. Current therapy of pulmonary and disseminated fungal diseases. *Chest* 1983; 83: 911-917.
52. Kucers A, Bennett NM. Amphotericin B. En: Kucers A, Bennett NM (eds). *The use of antibiotics*. 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia: JB Lipponcott, 1987; 1441-1477.
53. Drugs for treatment of systemic fungal infections. *Med Lett Drugs Ther* 1986; 28:41-44.
54. Graybill JR, Craven PC. Antifungal agents used in systemic mycoses: activity and therapeutic use. *Drugs* 1983; 25:41-62.
55. Drouhet E, Dupont B. Evolution of antifungal agents: past, present and future. *Rev Infect Dis* 1987; 9 (Suppl.1): 54-64.
56. Khoo SH, Bond J, Denning DW. Administering amphotericin B – a practical approach. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33:203-213.
57. Dutcher JD. The discovery and development of amphotericin B. *Dis Chest* 1968; 54: 40-42.
58. Warnock DW. Amphotericin B: an introduction. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28 (Suppl B): 27-38.
59. Mechlinski W, Schaffner CP, Ganis P, Avitabile G. Structure and absolut configuration of the polyene macrolide amphotericin B. *Tetrahedron Letters* 1970;44: 3873-3876.
60. Amphotericin B. En: McEvoy GK (ed). *American hospital formulary service drug information*. Bethesda, Md: American Society of Hospital Pharmacists, 1988: 71-74.

61. ER Squibb & Sons, Inc. Fungizone intravenous prescribing information. En: Physician's desk reference. 42<sup>nd</sup> edition. Oradell NJ: Medical Economics 1988; 2052-2053.
62. Fortún J, Cobo J, Pozuelo MJ. Anfotericina B liposomal. Características generales, indicaciones terapéuticas y experiencia clínica. Revista Iberoamericana de Micología 1994; 11: 111-115.
63. Daneshmend TK, Warnock DW. Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. Clin Pharmacokinet 1983; 8: 17-42.
64. Hoeprich PD, Huston AC. Stability of four antifungal antimicrobics in vitro. J Infect Dis 1978; 137: 87-90.
65. Bennett JE. Antifungal agents. En: Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 9<sup>th</sup> edition, New York: McGraw-Hill, 1996; 1175-1190.
66. Georgopapadakou N, Walsh TJ. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40 (2): 279-291.
67. Pesti M, Paku S, Novak EK. Some characteristics of nystatin-resistant sterol mutants of *Candida albicans*. Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae 1992; 29: 55-56.
68. Safe LM, Safe LH, Subden RE, Morris DC. Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei*, and *Candida tropicalis*. Can J Microbiol 1977; 23:298-401.
69. Athar MA, Winner HI. The development of resistance by *Candida* species to polyene antibiotics in vitro. J Med Microbiol 1971; 4: 505-517.
70. Bergoglio RM. Antifúngicos. En: Bergoglio RM. Antibióticos. 5ª edición, Buenos Aires: Panamericana, 1993; 357-377.



71. Dupont B, Drohnet E. Antifongiques. Encyclo Med Chir (Paris-France) Maladies Infectieuses 1990; 8004: M10.
72. Branch RA. Prevention of amphotericin B induced renal impairment. Arch Intern med 1988; 148: 2386-2394.
73. Francis P, Walsh TJ. Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics and antifungal therapy. Clin Infect Dis 1992; 15: 1003-1018.
74. Polak A, Scholer HJ. Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. Chemotherapy 1975; 21: 113-130.
75. Diasio RB, Bennett JE, Myers CE. Mode of action of 5-fluorocytosine. Biochem Pharmacol 1978; 27: 703-707.
76. Chouini-Lalanne, Malet-Martino MC, Martino R, Michel G. Study of the metabolism of flucytosine in *Aspergillus* species by  $^{19}\text{F}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1939-1945.
77. Fasoli M, Kerridge D. Isolation and characterization of fluoropyrimidine-resistant mutants in two *Candida* species. Ann New York Acad Sci 1988; 544: 260-263.
78. Fasoli MOF, Kerridge D, Morris PG, Torosantucci A.  $^{19}\text{F}$  nuclear magnetic resonance study of fluoropyrimidine metabolism. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 1996-2006.
79. Viviani MA. Flucytosine – what's is its future?. J Antimicrob Chemother 1995; 35: 241-244.
80. Harris BE, Manning WB, Federle TW, Diasio RB. Conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil by human intestinal microflora. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29 (1): 44-48.

81. Viviani MA, Tortorano AM, Pagano A, Vigevani GM, Gubertini G, Cristina S, et. al. European experience with itraconazole in systemic mycoses. J American Academy of Dermatology 1990; 23: 587-593.
82. Larsen RA. Fluconazole combined with flucytosine. En: Programme and abstracts of the second international conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis, Milan 1993. Abstract L43, p.100.
83. Polak A. Combination therapy for systemic mycosis. J Chemother 1990; 2: 211-217.
84. Just-Nubling G, Heise W, Ganger G, Dieckmann S, Enzenberger W, L'age M. et. al. Initial triple combination of amphotericin B, flucytosine and fluconazole in AIDS patients with acute cryptococcal meningitis. En: Programme and Abstracts of the Second International Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis, Milan 1993. Abstract P7-6, p.130.
85. Beggs WH, Sarosi GA. Combined activity of ketoconazole and 5-fluorocytosine on potentially pathogenic yeasts. Antimicrob Agents Chemother 1982; 21 (2): 355-357.
86. Kauffman CA, Frame PT. Bone marrow toxicity associated with 5-fluorocytosine therapy. Antimicrob Agents Chemother 1977; 11: 244-247.
87. Physician's Desk Reference Vol. 46. Oradell, New Jersey: Medical Economics, 1992: 1886.
88. Meyer R, Axelrod JL. Fatal aplastic anemia resulting from 5-fluorocytosine. JAMA 1974; 228: 1573.
89. Bryan CS, McFarland JA. Cryptococcal meningitis: fatal marrow aplasia from combined therapy. JAMA 1978; 239: 1068-1069.

- 90.** Stamm AM, Diasio RB, Dismukes WE, Shadomy S, Cloud GA, Bowles CA, Karam GH, Espinel-Ingroff A. Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with cryptococcal meningitis. *Am J Med* 1987; 83: 236-242.
- 91.** Dismukes WE, Cloud G, Gallis HA, et. al. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *N Engl J Med* 1987; 317: 331-341.
- 92.** Daneshmend TW, Warnock DW. Clinical pharmacokinetics of ketoconazole. *Clin Pharm* 1988; 14: 13-34.
- 93.** Heel RC, Brogden RN, Carmine A, Morley PA, Speight TM, Avery GS. Ketoconazole: a review of its therapeutic efficacy in superficial and systemic fungal infections. *Drugs* 1982; 23: 1-36.
- 94.** Hay RJ. Antifungal therapy and the new azole compounds. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28 (Suppl. A): 35-46.
- 95.** Van Tyle KH. Ketoconazole. Mechanisms of action, spectrum of activity, pharmacokinetics, drug interactions, adverse reactions and therapeutic use. *Pharmacotherapy* 1984; 4: 643-373.
- 96.** Saag MS, Dismukes WE. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32 (1): 1-8.
- 97.** Stevens DA. The new generation of antifungal drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7(6): 732-735.
- 98.** Parks LW, Lorentz RT, Casey WM. Functions for sterols in yeast membranes, p.393-409. En: Sutcliffe J, Georgopapadakou NH (ed). *Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy*. New York: Chapman & Hall, 1992.

99. Barrett-Bee K, Newbould L, Pinder P. Biochemical changes associated with the antifungal action of the triazole ICI 153,006 on *Candida albicans* and *Trichophyton quinckeanum*. FEMS Microbiol Lett 1991; 79: 127-132.
100. Georgopapadakou NH, Bertasso A. Effects of ergosterol inhibitors on chitin synthesis in vitro and in vivo. En: Adam A, Lode H, Rubinstein E. Recent advances in chemotherapy antimicrobial section II. Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy. Futuraped verlag, Munich.
101. Van des Bessche H. Biochemical targets for antifungal azole derivatives: hypothesis on the mode of action, p.313-351. En: McGinnis (ed). Current topics in medical micology. New York: Springer-Verlag, 1990.
102. Goa KL, Barradell LB. Fluconazole: an update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in major superficial and systemic mycoses in immunocompromised patients. Drugs 1995; 50 (40): 658-690.
103. Grant SM, Clissold SP. Fluconazole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutical potential in superficial and systemic mycoses. Drugs 1990; 39 (6): 877-916.
104. Ben-Yaacov R, Becker JM, Oppenheim A, Oppenheim M, Goldway R, Schmidt W, Jiang G, Koltin Y. Multidrug resistance in *Candida albicans*. J Cell Biochem 1995; 19B: 146.
105. Larsen RA. Azoles and AIDS. J Infect Dis 1990; 162: 727-730.
106. Richardson K, Cooper K, Marriott MS, Tarbit MH, Troke PF, Whittle PJ. Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent. Rev Infect Dis 1990; 12 (Suppl.3): S267-S271.

107. Brammer KW, Farrow PR, Faulkner JK. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (Suppl.3): S318-S326.
108. Zervos M, Silverman J, Meunier F. Fluconazol en el tratamiento de infecciones fúngicas: revisión. *Infectious Diseases in Clinical Practice Ed. Esp. Vol. 1 nº 4*, 1994.
109. Dermoumi H. In vitro susceptibility of fungal isolates of clinically important specimens to itraconazole, fluconazole and amphotericin B. *Chemotherapy Bassel* 1994; 40: 92-98.
110. Como JA, Dismukes WE. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med* 1994; 330: 267-272.
111. Bodey GP. Azole antifungal agents *Clin Infect Dis* 1992; 14 (Suppl. 11): S161-S169.
112. Hitchcock CA, Barrett-Bee KJ, Russell NJ. The lipid composition and permeability to azole of an azole- and polyene-resistant mutant of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1987; 25: 29-37.
113. Van den Bessche H, Marichal P, Gorrens J, Bellens D, Moereels H, Janssen PAJ. Mutation in cytochrome P-450-dependent 14  $\alpha$ -demethylase results in decreased affinity for azole antifungals. *Biochem Soc Trans* 1990; 18: 56-59.
114. Van den Bessche H, Marichal P, Odds FC, Le Jeune L, Coone MC. Characterization of an azole resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2602-2610.
115. Dewsnap DH, Stevens DA. Efficacy of oral amphotericin B in AIDS patients with thrush clinically resistant to fluconazole. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 389-393.

116. Baily GG, Perry FM, Denning DW et. al. Fluconazole-resistant candidosis in an HIV cohort. *AIDS* 1994; 8: 787-792.
117. Cameron ML, Schell WA, Bruch S, et. al. Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type i. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2449-2453.
118. Fox R, Neal KR, Leen CL et. al. Fluconazole-resistant *Candida* in AIDS. (letter; comment). *J Infect* 1991; 22: 201-204.
119. Smith D, Boag F, Midgley J et. al. Fluconazole-resistant *Candida* in AIDS patients. *J Infect* 1991; 23: 345-346.
120. Johnson EM, Warnock DW, Luker J et. al. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 103-114.
121. Paugam A, Dupouy-Camet J, Blanchet P et. al. Increased fluconazole resistance of *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 975-976.
122. Peetermans W, Bobbaers H, Verhaegen J, et. al, Fluconazole resistant *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient. *Acta Clin Belg* 1993; 48: 405-409.
123. Schäfer-Korting M. Pharmacokinetic optimisation of oral antifungal therapy. *Clin Pharmacokinet* 1993; 25: 329-341.
124. Fromtling RA. Fluconazole (Diflucan ®): a new antifungal triazole. *Drugs of Today* 1990; 26 (8): 547-556.

125. Sahai J, Gallicano K, Pakuts A, Cameron DW. Effect of fluconazole on zidovudine pharmacokinetics in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1994; 1103-1107.
126. Chin T, Fong IW, Van den Brouke A. Pharmacokinetics of fluconazole in serum and cerebrospinal fluid in a patient with AIDS and cryptococcal meningitis. *Pharmacotherapy* 1990; 10 (4): 305-307.
127. Back DJ, Tjia JF, Abel SM. Azoles, allylamines and drug metabolism. *Br J Dermatol* 1992; Feb 126 (Suppl. 39): 14-18.
128. Hanger DP, Jevons S, Shaw JT. Fluconazole and testosterone: in vivo and in vitro studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 646-648.
129. George D, Miniter P, Andriole VT. Efficacy of UK 109,496, a new azole antifungal agent, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*
130. Martin MV, Yates J, Hitchcock CA. Comparison of voriconazole (UK 109,496) and itraconazole in prevention and treatment of *Aspergillus fumigatus* endocarditis in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41 (1): 13-16.
131. UK 109,496 Investigator's Brochure Addendum, Jan.1995, Pfizer Central Research.
132. Guyton AC. Textbook of medical physiology. 8<sup>th</sup> edition, Philadelphia: WB Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovic Inc., 1991.
133. Tawara S, Matsumoto S, Kamimura T, Goto S. Effect of protein binding in serum on therapeutic efficacy of cephem antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(1); 17-24.

134. Quinn EL, Colville JM, Ballard L, Jones D, Debmant F. Ampicillin antimicrobial activity and pharmacological behavior with reference to certain gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* 1962; p.339-349.
135. Tompsett R, Schultz S, McDermott W. Relation of protein binding to the pharmacology and antibacterial activity of penicillin X, G, dihydro F and K. *J Bacteriol* 1947; 53: 581-595.
136. Pruul H, McDonald PJ. Potentiation of antibacterial activity of azithromycin and other macrolides by normal human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36 (1): 10-16.
137. Dutcher BS, Reynard AM, Beck ME, Cunningham RK. Potentiation of antibiotic activity by normal serum. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 820-826.
138. Marca G, Veronese M, Petrescu D. Enhancement of the bacteriostatic and bactericidal activities of chloramphenicol and tiamphenicol by normal human serum in vitro. *Chemotherapy* 1973; 18: 91-98.
139. Pruul H, Reynolds BL. Interaction of complement and polymyxin with gram-negative bacteria. *Infect Immun* 1972; 6: 709-717.
140. Diamond RD. *Cryptococcus neoformans*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4<sup>th</sup> edition, New York: Churchill Livingstone, 1993; 2331-2340.
141. Mody CH, Syme R. Effect of polysaccharide capsule and methods of preparation on human lymphocyte proliferation in response to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1991; 59 (9): 3101-3110.
142. Kozel TR, Wilson MA, Murphy JW. Early events in initiation of alternative complement pathway activation by the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1991; 59 (9): 3101-3110.



143. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Cowart RE, Sprigg HA, Tingler MJ, Jacobson ES. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis* 1993; 167: 186-190.
144. Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1986; 51 (1): 218-223.
145. Kozel TR, Highison B, Stratton CJ. Localization on encapsulated *Cryptococcus neoformans* of serum components opsonic for phagocytosis by macrophages and neutrophils. *Infect Immun* 1984; 43 (2): 574-579.
146. Kozel TR, Pfrommer GST, Guerlain AS, Highison BA, Highison HJ. Strain variation in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*: dissociation of susceptibility to phagocytosis from activation and binding of opsonic fragments of C3. *Infect Immun* 1988; 56 (11): 2794-2800.
147. Bhattacharjee AK, Bennett JE, Glaudemans CPJ. Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis* 1984; 6 (5): 619-624.
148. Cherniak R, Sundstrom JB. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1994; 62 (5): 1507-1512.
149. Kozel TR, Gotschlich EC. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J Immunol* 1982; 129 (4): 1675-1680.
150. Kozel TR, Pfrommer GST, Gerlain AS, Highison BA, Highison GJ. Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis* 1988; 10 (Supl. 2): S436-S439.
151. Granger DL, perfect JR, Durack DT. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest* 1985; 76: 508-516.

152. Drouhet E, Dupont B. Cryptococcosis. En: Jacobs PH, Nall L (eds). Antifungal drug therapy. A complete guide for the practitioner. New York 1990. Ch.15, pp.143-164.
153. Davis CHE. Criptococos. En: Braude AI, Davis CHE, Fierer J (coords). Microbiología Clínica. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 1984. 722-732.
154. Patterson TF, Andriole VT. Current concepts in cryptococcosis. Eur Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8 (5): 457-465.
155. Cohen J. The pathogenesis of cryptococcosis. J Infect 1982; 5: 109-116.
156. Levitz SM. The ecology of *Cryptococcus neoformans*, and the epidemiology of cryptococcosis. Rev Infect Dis 1991; 13: 1163-1169.
157. Verhoef J. *Cryptococcus*. En: Bennett JE, Hay RJ, Peterson PK. New strategies in fungal disease. 1993, Session IV, pp.179-191.
158. Lacobellis FA, Jacobs MI, et. Al. Primary cutaneous cryptococcosis. Arch Dermatol 1979; 115: 984-985.
159. Baes H, Van Cutsem J. Primary cutaneous cryptococcosis. Dermatologica 1985; 171: 357-361.
160. Concus AP, Helfaud RF, Imber MI, lerner EA, Sharpe RI. Cutaneous cryptococcosis mimicking molluscum contagiosum in a patient with AIDS. J Infect Dis 1988; 158: 897-898.
161. Chuck SL, Sande MA. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1989; 321 (12): 794-799.
162. Dismukes WE. Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. J Infect Dis 1988; 157: 6274-628.

163. Clark RA, Greer D, Atkinson W, Valainis GT, Hyslop N. Spectrum of *Cryptococcus neoformans* infection in 68 patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (5): 768-777.
164. Powderly WG. Therapy for cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1992; 14 (Suppl. 1): 554-559.
165. Mitchell DH, Sorrell TC, Allworth AM, Heath CHJ, McGregor AR, Papanoum K, Richards MJ, Gottlieb T. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 611-616.
166. Fujita N, Grinnell V, Edwards JE, Feldman RA. Management of central nervous system cryptococcosis. *The Western Journal of Medicine* 1980; 132 (2): 123-133.
167. Blasi E, Barluzzi R, Mazzolla R, Mosci P, Bistoni F. Experimental model of intracerebral infection with *Cryptococcus neoformans*: roles of phagocytes and opsonization. *Infect Immun* 1992; 60 (9): 3682-3688.
168. Polacheck I, Platt Y, Aronovitch J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1990; 58 (9): 2919-2922.
169. Emmons CV, Binford CH, Utz JP, Kwon-Chung KJ. *Medical mycology*. 3<sup>rd</sup> edition, Philadelphia: Lea & Febiger, 1977; 206-229.
170. Zuger A, Lonie E, Hozman RS, Simberkoff MS, Rahal JJ. Cryptococcal disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1988; 104: 234-240.
171. Kloos WE, Schleifer KH. *Staphylococcus*. En: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins 1986; 1013-1035.

172. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus*. En: Mandell GL, Douglas GLR Jr, Bennett JE. Principles and practice of infectious diseases. 3<sup>rd</sup> edition, New York: Churchill Livingstone, 1990; 1487-1510.
173. Kloos WE, Jorgensen JH. Staphylococci. En: Lennette EH. Manual of Clinical Microbiology. 4 th edition. Am Soc Microbiol 1985; 143-153.
174. Sheagren JN. *Staphylococcus aureus*. The persistent pathogen. (First of two parts). N Engl J Med 1984; 310: 1368-1373.
175. Clark RA, Kimball HR. Defective granulocyte chemotaxis in the Chediak Higashi syndrome. J Clin Invest 1971; 50: 2645.
176. Nahas GG, Taniers ML, Lennon JF. Direct measurement of leukocyte movility. Effects of pH and temperature. Proc Soc Exp Biol 1971 (new York), 138: 350.
177. Eggleton P, Gargan R, Fisher D. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. J Immun Methods 1989; 121: 105-113.
178. Gargan RA, Brumfitt W, Hamilton-Miller JMT. Failure of water to lyse polymorphonuclear neutrophils completely. Role of pH and implications for assessment of bacterial killing. J Immun Methods 1989; 124: 289-291.
179. Roilides E, Walsh TJ, Rubin M, Venzon D, Pizzo PA. Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34 (2): 196-201.
180. De la Fuente M. Changes in the macrophage function with aging. Comp Biochem Physiol 1985; 4 (81A): 935-938.
181. Rodríguez AB, Pariente JA, Prieto J, et. al. Effects of cefmetazol, cefoxitin and imipenem on polymorphonuclear leukocytes. Gen Pharmac 1987; 16: 613-615.

182. Corrales I. Nuevas fluorquinolonas. Actividad moduladora sobre macrófagos y linfocitos murinos y neutrófilos humanos. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid 1990.
183. Eyraud A, Descartes J, Lombard JY, Laschi-Loquerie A, Tachon P, Veyseyre C, Evreux JC. Effects of erythromycin, josamycin and spiramycin on rat polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. *Chemotherapy* 1994; 40: 317-323.
184. Fietta A, Merlin C, Gialdroni G. In vitro activity of two new oral cephalosporins cefixime and cefdinir (CI 983) on human peripheral mononuclear and polymorphonuclear leukocyte function. *Chemotherapy* 1994; 40: 317-323.
185. Mato R. Antimicrobianos de acción intracelular. Estudio comparativo de la acción moduladora celular de azitromicina y lomefloxacin. Tesis Doctoral, Madrid, 1992.
186. Forsgren A, Bergkvist PI. Effect of ciprofloxacin on phagocytosis. *Eur Clin Microbiol* 1985; 4 (6): 575-578.
187. Galgiani JN. Antifungal susceptibility tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1867-1870.
188. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; tentative standard. NCCLS Document M27-T. October 1995; Volume 15 Number 10.
189. Diamond RD, Root RK, Bennett JE. Factors influencing killing of *Cryptococcus neoformans* by human leukocytes in vitro. *J Infect Dis* 1972; 125 (4): 1367-1376.
190. Nassar F, Brummer E, Stevens DA. Different components in human serum inhibit multiplication of *Cryptococcus neoformans* and enhance fluconazole activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39 (11): 2490-2493.

191. Parascandola J (ed). The history of antibiotics: a symposium. American Institute of the History of Pharmacy. Madison, 1980; 136-140.
192. Roszkowski W, Roszkowski K, Jeljaszewicz J, Pulverer G. Antibacterial agents and the immune system. En; Jeljaszewicz J, Pulverer G (eds). Antimicrobial agents and immunity. London: Academic Press, 1986; 1-18.
193. Daschner FD. Antibiotics and host defence with special reference to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. J Antimicrob Chemother 1985; 16: 135-141.
194. Gillissen G, Opferkuch W, Peters G, Pulverer G. Influence of antibiotics on the host-parasite relationship III. Berlin: Springer-Verlag, 1989.
195. Szentivanyi A, Friedman H. Antibiotics and host immunity. New York: Plenum Press, 1987.
196. Miller TE. Host defence mechanisms, antibiotics and immunosuppressive agents – a complex relationship. Eur J Clin Microbiol 1984; 3 (4): 285-287.
197. Gorzynski EA. Interactions between microorganisms, antimicrobics and cells. ANNLD 1989; 6 (9): 69-76.
198. Labro MT, Benna JE. Effects of anti-infectious agents on polymorphonuclear neutrophils. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991; 10 (2): 124-131.
199. Van Vlem B, Vanholder R, De Paepe P, Vogelaers D, Ringoirs S. Immunomodulating effects of antibiotics: literature review. Infection 1996; 24 (4): 275-291.
200. Muñoz J, Geister R. Inhibition of phagocytosis by aureomycin. Proc Soc Exp Biol Med 1950; 75: 367.

- 201.** Moulder JW. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev* 1985; 49: 298-337.
- 202.** Barabara H, Wade MD, Gerald L, Mandell MD. Leucocitos polimorfonucleares: fagocitos profesionales competentes. *Investigaciones Upjohn* N°4 1984.
- 203.** Clark RA. The human neutrophils respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 1990; 161: 1140-1147.
- 204.** Verhoef J. Overview of the host defence system in an infectious process. En: *Clindamicina y modificación de la defensa del huésped*. Verhoef J. *Excepta Médica*. Madrid, 2, 1984.
- 205.** Drummond DC, Wong CW, Whitman LM, McCormack JG. The effects of amphotericin B, fluconazole and miconazole on neutrophil and lymphocyte function in a guinea pig model. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 375-384.
- 206.** Bjorksten B, Ray C, Quie PG. Inhibition of human neutrophil chemotaxis and chemoluminescence by amphotericin B. *Infect Immun* 1976; 14: 315-317.
- 207.** Marmer DJ, Fields BT, France GL, Steel RN. Ketoconazole, amphotericin B and amphotericin B methyl ester: comparative in vitro and in vivo toxicological effects on neutrophil function. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 20: 660-665.
- 208.** Alford RH, Cartwright BB. Comparison of ketoconazole and amphotericin B in interference with thymidine uptake by and blastogenesis of lymphocytes stimulated with *Histoplasma capsulatum* antigens. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24: 575-578.
- 209.** Johnson EM, Warnock DW, Richardson MD, Douglas CJ. In vitro effect of itraconazole, ketoconazole and amphotericin B on the phagocytic and candidacidal function of human neutrophils. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18: 83-91.

210. Supapidhayakul SR, Kizlaitis LR, Andersen BR. Stimulation of human and canine neutrophils metabolism by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19: 284-289.
211. Yamaguchi H, Abe S, Tokuda Y. Immunomodulation activity of antifungal drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 685: 447-457.
212. Davies RR, Zaini F. Antifungal drugs affecting the chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *Sabouraudia J Med Vet Mycol* 1985; 23: 119-123.
213. Abbruzzo GK, Giltinan DM, Capizzi TP, Fromtling RA. Influence of six antifungal agents on the chemoluminescence response of mouse spleen cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29 (4): 602-607.
214. Rowan-Kelly B, Ferrante A, Thong YH. Modification of polymorphonuclear leukocyte function by imidazoles. *Int J Immunopharmacol* 1984; 6: 389-393.
215. Senior DS, Shaw JTB. In vitro effects of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole on mouse lymphocyte proliferation and on *Candida* blastopore destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Int J Immunopharmacol* 1988; 10: 169-173.
216. Van Rensburg CEJ, Anderson R, Joone G, Van der Merwe MF, Eftychis HA. The effects of ketoconazole on cellular and humoral immune functions. *J Antimicrob Chemother* 1983; 11: 49-55.
217. Pont A, Graybill JR, Craven PC, Galoiani JN, Dismukes WE, Reitz RE, Stevens DA. High-dose ketoconazole therapy and adrenal and testicular function in humans. *Arch Intern Med* 1984; 144: 2150-2153.
218. Lewis JH, Zimmerman HJ, Benson GD, Ishak KG. Hepatic injury associated with ketoconazole therapy: analysis of 33 cases. *Gastroenterology* 1984; 86: 503-513.



- 219.** Mandell LA. Effects of antimicrobial and antineoplastic drugs on the phagocytic and microbicidal function of the polymorphonuclear leukocyte. *Rev Infect Dis* 1982; 4 (3): 683-697.
- 220.** Thong YH. Immunomodulation by antimicrobial agents. En: *Antimicrobial agents and immunity*. London: Academic press, 1986; 86-129.
- 221.** Scholer HJ. Chemotherapy of fungal diseases. Flucytosine. En: *Program and Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy*. Zurich, 1977.
- 222.** Harder EJ, Hermans PE. Treatment of fungal infections with flucytosine. *Arch Intern Med* 1975; 135: 231-237.
- 223.** Terrell CL, Hermans PE. Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. *Mayo Clin Proc* 1987; 62: 1116-1128.
- 224.** Sugar AM, Tija J. Effect of fluconazole on the interaction between human neutrophils and *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 3: 171-173.
- 225.** Odds FC, Webster CE. Effects of azole antifungals in host/parasite interactions relevant to candida infections. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22: 473-481.
- 226.** Burnett D, Chamba A, Hill SL, Stockley RA. Neutrophils from subjects with chronic obstructive lung disease show enhanced chemotaxis and extracellular proteolysis. *Lancet* 1987; 1043.
- 227.** Bignold LP. Preparative techniques influencing sedimentation of erythrocytes through the Hypaque-Ficoll medium used in the one-step technique for the separation of human polymorphonuclear leukocytes from whole blood. *J Immunol Methods* 1988; 106-147.

- 
228. Lichtman MA, Jackson AH, Peck WA. Lymphocyte monovalent cation metabolism: cell volume cation content and cation transport. *J Cell Physiol* 1972; 80: 383.
229. Venezio FR, Westenfelder GO, Phair JO. The adherence of polymorphonuclear leukocytes in patients with sepsis. *J Infect Dis* 1982; 145 (3): 351-357.
230. Harlan JM. Leukocyte-endothelial interactions. *J Am Soc Hematol* 1985; 65: 513.
231. Roche Y, Fay M, Gougerot-Pocidalo MA. Interleukin 1 production by antibiotic treated human monocyte. *J Antimicrob Chemother* 1980; 19: 781-790.
232. Labro MT, Babin-Chevage C, Pochet I, et. al. Interaction of ceftriaxone with human polymorphonuclear neutrophil function. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 849-855.
233. Gallin JI, Clark RA, Kimball HR. Radioanálisis de la quimiotaxis en granulocitos. *Immunol* 1973; 110:233.
234. Miller ME. Assays of phagocytic function. En: Vyas GN, Stites DP, Brecher G (eds). *Laboratory diagnosis of immunologic disorders*. Grune & Stratton, New York, 1975.
235. Horwitz MA. Phagocytosis of microorganisms. *Rev Infect Dis* 1982; 4 (1): 104-123.
236. Milatovic D. Influence of subinhibitory concentrations of antibiotics on opsonization and phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Clin Microbiol* 1984; 3 (4): 288-293.

- 237.** Lingaas E, Midvet T. The influence of cefoperazone, cefotaxime, ceftazidime and aztreonam on phagocytosis by human neutrophils in vitro. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23: 701-710.
- 238.** Cohen HJ, Chovaniec ME. Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes. *J Clin Invest* 1978; 61: 1081-1087.
- 239.** Siegel JP, Remington JS. Effect of antimicrobial agents on chemoluminescence of human polymorphonuclear leukocytes in response to phagocytosis. *J Antimicrob Chemother* 1982; 10: 505-515.
- 240.** Brajtbug J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34 (2): 183-188.
- 241.** Espinel-Ingroff A, Shadomy S. In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8 (4): 352-361.
- 242.** Adler-Moore JP, Proffitt RT. Development, characterization, efficacy and mode of action of Ambisome ® , a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B. *Journal of Liposome Research* 1993; 3 (3): 429-450.
- 243.** Francis P, Lee JW, Hoffman A, Peter J, Francesconi A, Bacher J, Schelhalmer J, Pizzo P, Walsh TJ. Efficacy of unilamellar liposomal amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits. *J Infect Dis* 1994; 169: 356-368.
- 244.** Fortún J, Cobo J, Pozuelo MJ. Anfotericina B liposomal. Características generales, indicaciones terapéuticas y experiencia clínica. *Revista Iberoamericana de Micología* 1994; 11: 111-115.
- 245.** Chunn CJ, Starr PR, Gilbert DN. Neutrophil toxicity of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12: 226-230.

- 246.** Yasui K, Masuda M, Takafumi M, Yamazaki M, Komiyama A, Akabane T, Murata K. Miconazole and amphotericin B alter polymorphonuclear leukocytes functions and membrane fluidity in similar fashions. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32 (12): 1864-1868.
- 247.** Pallister CJ, Warnock DW. Effect of antimicrobial and antineoplastic drugs alone and in combination on the phagocytic and candidacidal function of human polymorphonuclear leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23: 87-94.
- 248.** Van der Auwera P, Meunier F. In vitro effects of cilofungin (LY 121019), amphotericin B and amphotericin B-deoxycholate on human polymorphonuclear leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24: 747-763.
- 249.** Sullivan GW, Carper HT, Mandell GL. Pentoxifylline modulates activation of human neutrophils by amphotericin B in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36 (2): 408-416.
- 250.** Lorente, F. Acción de antibióticos y quimioterápicos sobre el sistema inmunológico inespecífico. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, Facultad de Medicina, Salamanca, 1980.
- 251.** Krause PJ, Maderazo EG, Soroggs M. Anormalidades de la adherencia de los neutrófilos en el recién nacido. *Pediatrics* (ed. esp.) 1982; 13 (2): 116-120.
- 252.** Kotler-Brajtburg J, Price HD, Medoff G, Schlessinger D, Kobayashi GS. Molecular basis for the selective toxicity of amphotericin B for yeast and filipin for animal cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 5: 377-382.
- 253.** Medoff G, Kobayashi GS. Strategies in the treatment of systemic fungal infections. *N Engl J Med* 1980; 302: 145-155.
- 254.** Bolard J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties?. *Biochim Biophys Acta* 1986; 864: 257-304.

- 255.** Atkinson AJ, Bennett JE. Amphotericin B pharmacokinetics in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 271-276.
- 256.** Block ER, Bennett JE, Livoti LG, Klein WJ, McGregor RR, Henderson L. Flucytosine and amphotericin B. Hemodialysis effects on the plasma concentration and clearance. *Ann Intern Med* 1974; 80: 613-617.
- 257.** Crawen PC, Ludden TM, Drutz DJ, Rogers W, Haeghe KA, Skrdlant HB. Excretion pathways of amphotericin B. *J Infect Dis* 1987; 155: 766-774.
- 258.** Starke JR, Mason O, Kramer WG, Kaplan SL. Pharmacokinetics of amphotericin B in infants and children. *J Infect Dis* 1987; 155: 744-766.
- 259.** Fisher JF, Taylor AT, Clark J, Rao R, Espinel-Ingroff A. Penetration of amphotericin B into the human eye. *J Infect Dis* 1983; 147-164.
- 260.** Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología Molecular de la Célula*. 1ª edición, Barcelona: Ediciones Omega, 1987; 1020-1082.
- 261.** Shinitzky M. An efficient method for modulation of cholesterol level in cell membranes. *FEBS* 1978; 85: 317-320.
- 262.** Joly V, Bolard J, Yeni P. In vitro models for studying toxicity of antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36 (9): 1799-1804.
- 263.** Berliner S, Weinberger M, Ben-Bassett M, Iavie G, Weinberger A, Giller S, Pinkhas J. Amphotericin B causes aggregation of neutrophils and enhances pulmonary leukostasis. *Am Rev Resp Dis* 1985; 132 (3): 602-605.
- 264.** Denning TJV, Davies RR. *Candida albicans* and the chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *Sabouraudia* 1973; 11: 210-221.

- 265.** Diasio RB, Lakings DE, Bennett JE. Evidence for conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluoruracil in humans: possible factor in 5-fluorocytosine clinical toxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 14 (6): 903-908.
- 266.** Harris BE, Manning BW, Federle TW, Diasio RB. Conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluoruracil by human intestinal microflora. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29 (1): 44-48.
- 267.** Vuddhakul V, Mai GT, McCormack JG, et. al. Suppression of neutrophil and lymphoproliferative responses in itraconazole but not fluconazole. *Int J Immunopharmacol* 1990; 12 (6): 639-645.
- 268.** Pawelec G, Ehninger G, Rehbein A, et. al. Comparison of immunosuppressive activities of the antimycotics itraconazole, fluconazole, ketoconazole and miconazole on human T-cells. *Int J Immunopharmacol* 1991; 13 (2-3).
- 269.** Van den Bossche H, Willemsens G, Cools W, Cornelissen F, Lauwes W, Cutsem J. In vitro and in vivo effects of the antimycotic drug ketoconazole on sterol synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17: 922-928.
- 270.** Van den Bessche H. Biochemical targets for antifungal azole-derivative. Hypothesis of the mode of action. *Curr Top med Mycol* 1985; 1: 313-315.
- 271.** Miettinen TA, Valtonen W. Ketoconazole and cholesterol synthesis (letter). *Lancet* 1984; 11: 1271.
- 272.** Kempen HJ, Van Son K, Cohen LH, Griffioen M, Verboom H, Havekes L. Effect of ketoconazole on cholesterol synthesis and on HMG-CoA reductase and LDL-receptor activities in Hep G2 cells. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 1245-1249.
- 273.** Joly V, Saint-Pierre-Chazalet M, Saint-Julien L, Bolard J, carbon C, Yeni P. Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of

- amphotericin B against renal tubular cells in primary culture. *J Infect Dis* 1992; 165: 337-343.
- 274.** Buttke TM, Chapman SW. Inhibition by ketoconazole of mitogen-induced DNA synthesis and cholesterol biosynthesis in lymphocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24 (4): 478-485.
- 275.** Yuli I, Tomonaga A, Snyderman R. Chemoattractant receptor functions in human polymorphonuclear leukocytes are divergently altered by membrane fluidizers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 5906-5910.
- 276.** Anderson R. Erythromycin and roxithromycin potentiate human neutrophil locomotion in vitro by inhibition of leukoattractant-activated superoxide generation and autooxidation. *J Infect Dis* 1989; 159 (5): 966-973.
- 277.** Abruzzo GK, Fromtling RA, Turnbull TA, Giltinan DM. Effects of bifonazole, fluconazole, itraconazole and terbinafine on the chemoluminescence response of immune cells. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 61-68.
- 278.** Pascual A, García I, Conejo C, Perea EJ. Uptake and intracellular activity of fluconazole in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37 (2): 187-190.
- 279.** Nightingale CH, Quintiliani R, Nicolau DP. Intelligent dosing of antimicrobials. En: Remington JS, Swartz MN (eds). *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*. Blackwell Scientific Publications, USA 1994 (pp. 252-265).
- 280.** Pellet MV. El plasma sanguíneo. En: Pellet MV. *Fisiología Humana*. Medio Interno. Vol. 3, pp.34-52., editorial Marban, Madrid, 1979.
- 281.** Meyohas MC, Meynard JL, Bollens D, Roux P, Delud AM, Poirrot JL, Rozenbaum W, Mayaud C, Frottier J. Treatment of non-meningeal cryptococcosis in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1996; 33: 7-10.

282. Powderly WG. Recent advances in management of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. Clin Infect Dis 1996; 22 (Supl. 2): S119-S123.
283. Zeind CS, Cleveland KO, Menon M, Brown JR, Solomon DK. Cryptococcal meningitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Pharmacotherapy 1996; 16 (4): 547-561.
284. Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Barlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, Fromtling RA, HA11 GS, Hughes CE, Odds FC, Dugar AM. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. Antimicrob Agents Chemother 1990; 1648-1654.
285. Carrillo-Muñoz AJ, Abarca-Salat L, Quindós G. Pruebas de estudio de sensibilidad a los antifúngicos I. Factores y variables que influyen en su realización en el laboratorio. Revista iberoamericana de Micología 1994; 11: 105-110.
286. Odds FC, De Backer T, Dams G, Vranckx L, Woestenborghs F. Oxygen as limiting nutrient for growth of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 1995; 33 (4): 995-997.
287. Allen WP, Evans EE. The inhibition of growth of *Cryptococcus neoformans* by normal serums. Bacteriol Proc 1955; 92-93.
288. Petrou MA, Rogers TR. The inhibitory effect of serum on the growth of *Torulopsis glabrata*. J Med Microbiol 1988; 25: 213-220.
289. Anna EJ. Rapid in vitro capsule production by cryptococci. Am J med Tech 1979; 45: 585-588.
290. Rolinson GN. The significance of protein binding of antibiotics in antibacterial chemotherapy. J Antimicrob Chemother 1980; 6: 311-317.



- 291.** Odenholt I, Holm SE, Cars O. Effect of antibiotic protein binding on the killing rate of *Staphylococcus aureus* and the paradoxical phenomenon. *Chemotherapy* 1987; 33: 331-339.
- 292.** Bergan T, Engeset A, Olszewski W. Does serum protein binding inhibit tissue penetration of antibiotics?. *Rev Infect Dis* 1987; 9 (4): 713-718.